

**\* NOTICES \***

**JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.\*\*\* shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

**(57) [Claim(s)]**

1. It is how to measure existence of a biopolymer sample in a sample, and expose a (i) this sample under a condition which combination produces between this compatibility molecule and this sample in a compatibility molecule for this sample.;

(ii) When this compatibility molecule is not replicative form RNA, combine replicative form RNA with a compatibility molecule used by stage (i) in either a stage (i) front or the back.;

(iii) or [ being combined with a compatibility molecule which uses RNA-dependent RNA polymerase and is combined with a sample ] -- or it was combined. Or a method of consisting of detecting RNA which exerted a catalysis on a duplicate of replicative form RNA which is the compatibility molecule combined with a sample, and was built by reaction of; and (iv) stage (iii).

2. Method of the 1st paragraph of claim that sample is nucleic acid, compatibility molecule is replicative form RNA containing fragment which has arrangement of about 20 which is complementarity thru/or about 4000 bases to arrangement of fragment of this sample, and duplicate of this replicative form RNA is after dissociation of this RNA from sample.

3. Combination to a compatibility molecule of replicative form RNA is performed by the 2nd joining segment combined with a compatibility molecule without losing the singularity of combination between the 1st joining segment and a compatibility molecule which were combined with replicative form RNA without losing duplicate possibility by RNA-dependent RNA polymerase, and a sample, A method of the 1st paragraph of a claim that is whether these 1st and 2nd joining segments of each other are combined in share, and that either which is specific binding pairs.

4. Method of the 1st paragraph of claim performed at least by hybridization with fragment of nucleic acid of length 10 base that it is combined with replicative form RNA and compatibility molecule, or combination of replicative form RNA to compatibility molecule is included in it.

5. Method of the 2nd paragraph of claim that RNA-dependent RNA polymerase is Qbeta replicase, and is mold for duplicate by in vitro one according [ recombination replicative form RNA ] to this replicase.

6. Method of the 5th paragraph of claim that radiolabeling of reproduced RNA which reproduction of replicative form RNA was performed by radiolabeling ribonucleoside 5'-triphosphate, and was obtained is carried out.

7. Method of the 3rd paragraph of claim that RNA-dependence RNA polymerase is Qbeta replicase and is mold for duplicate by this replicase in vitro in replicative form RNA.

8. Method of the 7th paragraph of claim that radiolabeling of reproduced RNA which reproduction of replicative form RNA was performed by radiolabeling ribonucleoside 5'-triphosphate, and was obtained is carried out.

9. Method of the 8th paragraph of claim that the 1st joining segment and the 2nd joining segment of

each other are combined by disulfide portion in share before exposing compatibility molecule to sample.

10. The 1st joining segment is formula- $\text{O-PO}_2\text{-NH-(CH}_2\text{)}_n\text{-S-}$  (it is combined with 5'-carbon of a 5'-nucleotide of plurality type RNA, and a phospho lamination date portion in a formula)  $n \text{ -- } 2-8 \text{ --}$  it is -- being expressed -- the 2nd joining segment -- formula- $\text{O-PO}_2\text{-NH-(CH}_2\text{)}_m\text{-S-}$  (it is combined with 5'-carbon of a 5'-nucleotide of a nucleic-acid-affinity molecule, and a phospho lamination date portion in a formula)  $m$  may be the same as  $n$ , or may differ --  $2-8 \text{ --}$  it is -- a method of the 9th paragraph of a claim expressed.

11. A compatibility molecule is the nucleic acid which has a fragment of at least one pudding residue, A method of the 8th paragraph of a claim that this fragment is in a 3'-end of a compatibility molecule, are in the outside of a sample joint fragment of a compatibility molecule, and a 3'-end of this compatibility molecule is combined with 5'-carbon of a 5'-nucleotide of replicative form RNA by phosphodiester.

12. A method of the 9th paragraph of a claim that a compatibility molecule and replicative form RNA are combined in a smart probe.

13. A method of the 8th paragraph of a claim that the 1st joining segment and the 2nd joining segment are specific binding pairs.

14. A method of the 13th paragraph of a claim that one side of the 1st and 2nd joining segments is biotinyl, and is the avidin combined with a compatibility molecule or replicative form RNA when another side formed biotinyl and a complex.

15. A biotinyl portion is formula- $\text{O-PO}_2\text{-NH-(CH}_2\text{)}_p\text{-(SS)}_q\text{(CH}_2\text{)}_r\text{NH-}$  (an account of formula Nakagami phospho lamination date portion is combined with 5'-carbon of a 5'-nucleotide, and it differs and whether  $p$  and  $r$  are the same) It is  $2-8$  respectively and  $q$  is 0 or 1. A method of the 14th paragraph of a claim combined with a 5'-nucleotide of replicative form RNA by spacer arm.

16. A method of the 15th paragraph of a claim that forms this biotinyl by which a compatibility molecule is the antibody by which the biotinylate was carried out, and avidin was combined with replicative form RNA, and a complex.

17. A method of the 15th paragraph of a claim that forms this biotinyl by which a compatibility molecule is the lectin which carried out the biotinylate, and a horse mackerel bottle was combined with replicative form RNA, and a complex.

18. Photochemically, a compatibility molecule is FOTOB1 thione or enzymatically, By dATP combined with biotinyl by C-6 of dUTP combined with biotinyl by C-5 of an uracil portion, UTP, or an adenine portion, or C-8. Or it is [ in / chemically / 5'-carbon of a 5'-nucleotide ] formula- $\text{O-PO}_2\text{-NH-(CH}_2\text{)}_s\text{-(SS)}_t\text{(CH}_2\text{)}_u\text{NH-}$  (it is combined with 5'-carbon of a 5'-nucleotide, and a phospho lamination date portion in a formula) A method of the 15th paragraph of a claim that is the nucleic acid by which the biotinylate was carried out with whether  $s$  and  $u$  are the same and a spacer arm of it differing, and being  $2-8$  respectively, and  $t$  being  $0-1$  and in which avidin is carrying out complex formation to biotinyl combined with replicative form RNA.

19. A method of the 18th paragraph of a claim that the biotinylate of the compatibility molecule is carried out with 5'-carbon of a 5'-nucleotide.

20. A method of the 9th paragraph of a claim that replicative form RNA is separated from a compatibility molecule by returning disulfide which is after combination with a sample of a compatibility molecule combined with replicative form DNA, and has combined the 1st and 2nd joining segments in share before a duplicate of replicative form RNA.

21. A method of the 10th paragraph of a claim that replicative form RNA is separated from a compatibility molecule by reduction of disulfide which is after combination with a sample of a compatibility molecule combined with replicative form RNA, and has combined the 1st and 2nd

joining segments in share before a duplicate of replicative form RNA.

22. A method of the 11th paragraph of a claim of being after combination with a sample of a compatibility molecule combined with replicative form DNA, and separating replicative form RNA from a compatibility molecule before a duplicate of replicative form RNA by cutting a phosphodiester bond by beta-desorption following depurination and it by acid.

23. A method of the 12th paragraph of a claim that reduction of disulfide which is after combination with a sample of a compatibility molecule combined with replicative form DNA, and has combined the 1st and the 2nd joining segment in share before a duplicate of replicative form RNA separates replicative form RNA from a compatibility molecule.

24. In a sample, are after combination a compatibility molecule which q of a spacer group is 1 and was combined with replicative form RNA, and before a duplicate of replicative form RNA, A method of the 15th paragraph of a claim that replicative form RNA is separated from a compatibility molecule by reduction of disulfide of a spacer arm which has combined replicative form RNA with biotinyl.

25. Are after combination to a sample of a compatibility molecule which q of a spacer group is 1 and was combined with replicative form RNA, and before a duplicate of replicative form RNA, A method of the 16th paragraph of a claim that reduction of disulfide of a spacer arm which combines replicative form RNA with biotinyl separates replicative form RNA from a compatibility molecule.

26. Are 1, and q of a spacer group is after combination to a sample of a compatibility molecule combined with; replicative form RNA, and before a duplicate of replicative form RNA, A method of the 17th paragraph of a claim that reduction of disulfide of a spacer arm which combines replicative form RNA with biotinyl separates replicative form RNA from a compatibility molecule.

27. Are 1, and q of a spacer group is after combination to a sample of a compatibility molecule combined with; replicative form RNA, and before a duplicate of replicative form RNA, A method of the 19th paragraph of a claim that reduction of disulfide of a spacer arm which combines replicative form RNA with biotinyl separates replicative form RNA from a compatibility molecule.

28. A method of the 4th paragraph of a claim that RNA-dependence RNA polymerase is Qbeta replicase and is a mold for a duplicate by this replicase in vitro in recombination replicative form RNA.

29. A method of the 28th paragraph of a claim that a compatibility molecule is nucleic acid.

30. A compatibility molecule which can be specifically combined with a molecule to have been combined with replicative form RNA in which it is reproduced by RNA dependent RNA polymerase and deals.

31. Combination to a compatibility molecule of replicative form RNA, It is performed by the 2nd joining segment combined with a compatibility molecule without losing the singularity of combination between the 1st joining segment and a compatibility molecule which were combined with replicative form RNA without losing duplicate possibility by RNA-dependent RNA polymerase, and a sample, A 30th parent term sum nature child [ of a claim ]-replicative form RNA hybrid which are whether the covalent bond of these 1st and 2nd joining segments of each other is carried out, and that either which is specific binding pairs.

32. A 31st parent term sum nature child [ of a claim ]-replicative form RNA hybrid which is a mold for a duplicate by in vitro ones according [ replicative form RNA ] to Qbeta replicase.

33. A 32nd parent term sum nature child [ of a claim ]-replicative form RNA hybrid which the 2nd joining segment and the 1st joining segment combine with a compatibility molecule and replicative form RNA in share respectively, and is mutually combined by disulfide portion in share.

34. The 1st joining segment is formula- $O-PO_2-NH-(CH_2)_n-S-$  - (it is combined with 5'-carbon of a 5'-nucleotide of plurality type RNA, and a phospho lamination date portion in a formula)  $n = 2-8$  --

it is -- being expressed -- the 2nd joining segment -- formula- $O-PO_2-NH-(CH_2)_m-S-$  (it is combined with 5'-carbon of a 5'-nucleotide of a nucleic-acid-affinity molecule, and a phospho lamination date portion in a formula) m may be the same as n, or may differ -- 2-8 -- it is -- a 33rd parent term sum nature child [ of a claim ]-replicative form RNA hybrid expressed.

35. A compatibility molecule is the nucleic acid which has a fragment of at least one pudding residue, This fragment is in a 3'-end of a compatibility molecule, and it is in the outside of a fragment of a compatibility molecule which has the arrangement which is complementarity to arrangement of a target fragment of a sample, A 32nd parent term sum nature child [ of a claim ]-replicative form RNA hybrid by which a 3'-end of this compatibility molecule is combined with 5'-carbon of a 5'-nucleotide of replicative form RNA by phosphodiester.

36. A 32nd parent term sum nature child [ of a claim ]-replicative form RNA hybrid whose 2nd joining segment is a specific binding pair about the 1st joining segment.

37. A 36th parent term sum nature child [ of a claim ]-replicative form RNA hybrid which one side of the 1st and 2nd joining segments is biotinyl, and is the avidin combined with a compatibility molecule or replicative form RNA when another side formed biotinyl and a complex.

38. A biotinyl portion is formula- $O-PO_2-NH-(CH_2)_p(SS)_q(CH_2)_rNH-$  - (an account of formula Nakagami phospho lamination date portion is combined with 5'-carbon of a 5'-nucleotide, and it differs and whether p and r are the same) It is 2-8 respectively and q is 0 or 1. A 37th parent term sum nature child [ of a claim ]-replicative form RNA hybrid combined with a 5'-nucleotide of replicative form RNA by spacer arm.

39. A 38th parent term sum nature child [ of a claim ]-replicative form RNA hybrid a compatibility molecule is [ hybrid ] in a biotinylate antibody.

40. A 38th parent term sum nature child [ of a claim ]-replicative form RNA hybrid whose compatibility molecule is biotinylate lectin.

41. Photochemically, a compatibility molecule is photograph biotin or enzymatically, By dATP combined with biotinyl by C-6 of dUTP combined with biotinyl by C-5 of an uracil portion, UTP, or an adenine portion, or C-8. Or it is [ in / chemically / 5'-carbon of a 5'-nucleotide ] formula  $O-PO_2-NH-(CH_2)_s(SS)_t(CH_2)_uNH-$  - (it is combined with 5'-carbon of a 5'-nucleotide, and a phospho lamination date portion in a formula) A 38th parent term sum nature child [ of a claim ]-replicative form RNA hybrid which is the nucleic acid by which the biotinylate was carried out with whether s and u are the same and a spacer arm of it differing, and being 2-8 respectively, and t being 0-1 and in which avidin is carrying out complex formation to biotinyl combined with replicative form RNA.

42. A 41st parent term sum nature child [ of a claim ]-replicative form hybrid to which the biotinylate of the compatibility molecule is carried out with 5'-carbon of a 5'-nucleotide.

43. A compatibility molecule of replicative form RNA has joined together via a joining segment combined with replicative form RNA without losing duplicate possibility by RNA-dependent RNA polymerase, And a 30th parent term sum nature child [ of a claim ]-replicative form RNA hybrid in which said joining segment is what can combine between replicative form RNA and compatibility molecules by a covalent bond.

44. Without losing the in vitro duplicate possibility of replicative form RNA by an RNA dependent RNA polymerase, are replicative form RNA combined with a joining segment, and; this joining segment, RNA in which it is reproduced by RNA dependent RNA polymerase which can join together by share combination to a joining segment which has combined combination between replicative form RNA and a compatibility molecule with a compatibility molecule, and deals.

45. Replicative form RNA of the 44th paragraph of a claim that is a mold for a duplicate by in vitro Qbeta replicase.

46. Replicative form RNA of the 45th paragraph of a claim whose joining segment with which replicative form RNA is combined is sulfur, biotinyl, or the avidin (this biotinyl is combined with replicative form RNA on the other hand) combined with biotinyl by complex formation.
47. A joining segment is biotinyl or avidin and in both case, Biotinyl is formula- $O-PO_2-NH-(CH_2)_p(SS)_qCH_2NH-$  (it is combined with 5'-carbon of a 5'-nucleotide, and an account of formula Nakagami phospho lamination date portion) It differs [ whether p and r are the same and ], and is 2-8 respectively, and q is 0 or 1. Replicative form RNA of the 46th paragraph of a claim combined with a 5'-nucleotide of replicative form RNA by spacer arm.
48. A joining segment is sulfur and it is formula- $O(PO_2)NH(CH_2)_p-$  (it is combined with 5'-carbon of a 5'-nucleotide, and a phospho lamination date group in a formula) Replicative form RNA of the 46th paragraph of a claim combined with a 5'-nucleotide of replicative form RNA by spacer group of p being 2-8.
49. A smart probe which consists of replicative form RNA in which it is reproduced by RNA dependent RNA polymerase combined with a nucleic-acid-affinity molecule in share, and deals.
50. Replicative form RNA is a mold for a duplicate by Qbeta replicase, 5'-carbon of a 5'-nucleotide of replicative form RNA. And 5'-carbon of a 5'-nucleotide of a compatibility molecule by a portion of formula- $O(PO_2)NH(CH_2)_ySS(CH_2)_zNH(PO_2)O-$  (it differs [ whether it is the same the inside y and z of a formula, and ], and is 2-8 respectively). A smart probe of the 49th paragraph of a claim combined.
51. A smart probe of the 50th paragraph of a claim with which a compatibility molecule has both a 5'-clamp fragment and a 3'-clamp fragment.
52. A smart probe of the 50th paragraph of a claim that is replicative form recombination RNA which has a fragment in which replicative form RNA has arrangement of a fragment and arrangement of complementarity in a 3'-end of a compatibility molecule.
53. A 30th parent term sum nature child [ of a claim ]-replicative form RNA hybrid combined with replicative form RNA by hybridization of a fragment of nucleic acid of the length of at least 10 bases and replicative form RNA which a compatibility molecule was combined with this compatibility molecule, or were contained in it.
54. A 53rd parent term sum nature child [ of a claim ]-replicative form RNA hybrid which is a mold for a duplicate by Qbeta replicase in vitro in replicative form RNA.
55. A 54th parent term sum nature child [ of a claim ]-replicative form RNA hybrid whose compatibility molecule is protein.
56. A 54th parent term sum nature child [ of a claim ]-replicative form RNA hybrid whose compatibility molecule is nucleic acid.

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

**JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**OPERATION**

---

It is related as a thing through (for example, a salt bridge, a hydrogen bond, and a hydrophobic interaction).

The expert can determine easily conditions which combination between a compatibility molecule in a sample and a sample which may exist starts. In detail, the expert can determine easily conditions which can produce combination between a compatibility molecule and a sample which are considered to be a "specific binding" in a technical field. A compatibility molecule usually depends such singularity on higher singularity being shown to a sample rather than other substances and structures (for example, a container wall and a solid support) in a sample as understood in a technical field.

Samples which perform an assay method of this invention may be a blood serum, other body fluid, or a specimen in the raw [ of a biological substance like a tissue culture medium or food ] state. More typically, this method is enforced about a sample of a processed specimen obtained by performing various kinds of processings which remove a substance which bars detection of a sample by producing nonspecific combination of a compatibility molecule for a raw specimen. A raw specimen is processed and a method for obtaining a sample which was suitable with an assay method of this invention is well known in a technical field.

This method In this way, Grunstein, Hognes, Proc.Natl.Acad.Sci.(U. S.A.) 72 volume, the 3961 – 3965 pages (1975) (for example, refer to Falkow, Moseley, and United States patent No.4,358,535; and Shafritz, and United States patent No.4,562,159 etc.) colony hybridization method — or, Benton, Davis, Science, 196 volumes, and the 180 – 182 pages (1977) Plei-ku lift method — therefore, it can perform about nucleic acid obtained from a cell. This method is isolated from a cell of a viroid, a virus, or a specimen again, it was made to adhere on a solid support (a solid support on a dip stick (dipstick), a micro dilution plate, a wall of a well, etc. are included) (Gillespie, Spiegelman, and J.Mol.Biol. — 12 volumes) It can carry out also about 829 –842–page (1965) nucleic acid. this method is isolated from a specimen again — "DOTSUTO (dot)" blotting (Kafatos et al.) Nucl.Acid.Res.7 volume, 1541 – 1552 pages (1979); White, Bancroft, J.Biol.Chem.257 volume, 8569 –8572–page (1982); — Southern blotting (Southern and J.Mol.Biol — 98 volumes) 503–; [ 517page(1975) ] "Northern" blotting (Thomas and Proc.Natl.Acad.Sci. (U. S.A.) — 77 volumes) 5201 – 5205 pages (1980); it can carry out further also about nucleic acid fixed by electroblotting (Stellwag, Dahlberg;Nucl.Acids.Res.8 volume, 299 – 317 pages (1980)) on a solid support. Nucleic acid of a specimen is water layer hybridization (Britten, Kohre, and 161 Science(s)) about this invention again. 527 – 540 pages (1968), and water / organic intermediate layer hybridization (it can also assay by Kohre et al., 16 Biochemistr(ies), and a method applied to 5329 – 5341 pages (1977).) Although water / organic intermediate layer hybridization has an advantage which advances at a very quick speed, it is not suitable when a joining segment of fusibility has combined with an

organic layer like biotin at a nucleic-acid-affinity molecule.

An assay method of this invention is isolated from a specimen, and again DOTSUTO blotting and "Western" blotting (for example, refer to Example XII), Or \*\* made to stick to a solid support on a micro dilution plate, a well, or a dip stick can also perform protein and a poly polysaccharide which were fixed on a solid support.

A method of this invention can be applied to detection of protein from microorganism like cellularity protein of a specimen, a poly polysaccharide (for example, refer to Example XI) of all the cell surface, or bacteria of a replica plate and yeast fixed on a solid support, a poly polysaccharide, etc. further again.

Replicative form RNA must be combined with a compatibility molecule in the back before a compatibility molecule combines with a sample which may exist in a sample currently assayed. What kind of RNA which it is reproduced by the automatic reaction which is reproduced catalytically namely, in which a catalyst is carried out by the RNA dependent RNA polymerase by in vitro one, and is sold at in vitro one may be sufficient as "replicative form RNA." RNA polymerase suitable for practice of this invention and replicative form RNA are described by the following Examples I.

In relation to this, bacteriophage Qbeta described here is limited to neither a specific variety and mutant, nor its population. Such reference especially is made to what kind of variety and mutant which cause production of the RNA polymerase of a RNA dependency on the occasion of infection of E.coli infection of bacteriophage Qbeta is suspected to be, or its population, if it does not restrict.

facing infection of the bacteria infection by it is suspected to be -- an RNA dependent RNA polymerase -- and, About other phage which produces available replicative form RNA which can be reproduced automatically catalytically by in vitro one to this invention relevant to it. For example, refer to Miyake et al., Proc.Natl.Acad.Sci.(U. S.A.) 68 volume, and 2022 - 2024 pages (1971).

Although replicative form RNA can be combined with a compatibility molecule by the way many differ, some of them are described by the example.

If replicative form RNA combines with a compatibility molecule before a compatibility molecule combines with a sample, The compatibility molecule which it is indispensable that the singularity over the sample of a compatibility molecule is not lost, namely, it combined with replicative form RNA must be maintaining the capability to carry out intermediary combination also of some unique targets, in the sample currently examined in assay as well understood to an expert.

If replicative form RNA combines with a compatibility molecule after a compatibility molecule combines with a sample, it is indispensable that a compatibility molecule which replicative form RNA combined is separable from replicative form RNA which has not been combined with a compatibility molecule as well known by those in whom this also became skillful. This is not an important problem. In the usual case, such separation is easily attained by only washing about a compatibility molecule which was combined with a sample and was further combined with a solid support. It is because relation between a compatibility molecule and a solid support is not broken greatly that replicative form RNA combines with a united compatibility molecule. When the usual case is not obtained, such separation is easily attained by either of the art of chromatography or electrophoresis known well.

It seems that the combination to a compatibility molecule of replicative form RNA must not make the last have to lose replication ability of RNA by RNA polymerase of a RNA dependency. namely, a gestalt of the molds of a duplicate replicative form RNA combined with a compatibility molecule is a mold of a duplicate by an RNA dependent RNA polymerase, or is separated from a compatibility molecule, and according to an RNA dependent RNA polymerase -- intermediary \*\*\*\* -- things are made.

The compatibility molecule itself is replicative form RNA, and one type of a relation between replicative form RNA and a compatibility molecule is recombination RNA containing \*\*\*\*\* with mainly suitable arrangement. Probably, it is turning [ molecule / such / compatibility ] to a sample which are nucleic acid and its fragment. Probably, compatibility molecules are Miele et al. and recombination RNA previously prepared by a method of quotation and Kramer et al., and American patent application serial number No.614,350 so that a partial sequence of a sample and complementary arrangement might be included preferably from replicative form RNA. In order for a portion of this complementary arrangement to give singularity, in order for length not to lose those with 10 ribonucleotides, and replication ability, length is a thing to about 4500 nucleotides at least. It rearranges to example IX and an example using RNA as a compatibility molecule is explained. Combination between replicative form RNA and a compatibility molecule may be un-sharing or share combination.

Un-sharing combination between a compatibility molecule and replicative form RNA can be formed by hybridizing with or or whether replicative form RNA combines with a compatibility molecule further by being taken in and lending and a taken-in portion to which a nucleic acid part of complementary arrangement of a replicative form RNA fragment combines with a compatibility molecule. Refer to Dattagupta et al. and European Patent application public-relations No.0154884 for what combines such a nucleic acid fragment with a compatibility molecule of protein, for example. A method of making combine such a fragment, or making take in, and being [ a method / it ] sufficient and carrying out about a compatibility molecule of nucleic acid, is well known in a technical field. Separation from a compatibility molecule combined with a sample of replicative form RNA to which replicative form RNA is reproduced and detection becomes possible using such combination between a compatibility molecule and replicative form RNA, It is attained by heating more than a melting temperature of a complex with a nucleic acid part which joined together or was taken into a replicative form RNA part and a compatibility molecule.

Un-sharing combination between replicative form RNA and a compatibility molecule is performed again through combination of the 1st joining segment combined with replicative form RNA, and the 2nd joining segment combined with a compatibility molecule, and a specific bonded pair is in a joining segment here very.

Share combination between replicative form RNA and a compatibility molecule is performed through combination (except for combination produced from the secondary tertiary structure of a complex) between only 1 share both. Usually, a covalent bond between the 1st joining segment in which share combination carried out the covalent bond to replicative form RNA, the 2nd joining segment that carried out the covalent bond to a compatibility molecule, and the further 1st and the 2nd joining segment is \*\*\*\* intermediary \*\*\*\*.

here -- having stated -- a replicative form -- RNA -- or -- compatibility -- a molecule -- receiving -- a joining segment -- " -- a share ---like -- combination -- " -- or -- " -- a share ---like -- connection -- " -- or -- " -- a share ---like -- junction -- ". All the combination other than combination produced from the secondary tertiary structure between a joining segment, each replicative form RNA, or a compatibility molecule means share-like. With "combination (joining)" to replicative form RNA or a compatibility molecule of a joining segment described here, "connection (linkage)", or "junction (connection)." unconditionedness -- a joining segment -- "share ---like -- " -- or it means "and combining with replicative form RNA or a compatibility molecule, respectively, or connecting in "un-sharing." combination [ "un-share ] or connection, and junction mean un-sharing-like [ at least some combination other than combination by the secondary tertiary structure between a joining segment, and replicative form RNA or a compatibility molecule ].

It is share combination between a joining segment and replicative form RNA, and although the



replication ability of RNA is not lost by it, the following are contained as some examples.

(a) A joining segment is a phosphate group.

The thing between phosphoric acid and 5'-carbon of the 5'-nucleotide of replicative form RNA which has a direct combination.

The phosphoric acid joining segment combined with 5'-carbon of the 5'-nucleotide of replicative form RNA usually 3'-carbon of the 3'-nucleotide of a nucleic-acid-affinity molecule. By or the joining segment considered to have combined with the 3'-end of a nucleic-acid-affinity molecule. The direct covalent bond to 3'-carbon of the 3'-nucleotide of the nucleic acid fragment which is carrying out the covalent bond to 3'-carbon of the 3'-nucleotide of a compatibility molecule via phosphoric acid in 5'-carbon of the 5'-nucleotide is \*\*\*\* intermediary \*\*\*\*. 5' end nucleotide of replicative form RNA can carry out Lynn intervention of the 5' carbon by T4 polynucleotide kinase by a known method in a technical field. Refer to Example I. The nucleic acid joining segment of a compatibility molecule or a compatibility molecule is connectable with 5'-phosphoric acid of the 5'-nucleotide of replicative form RNA by the known method of using T4 RNA ligase next. The reaction of this latter as known in; technical field which will advance more efficiently if ribonucleotide is a 3'-end of a compatibility molecule (or joining segment of a compatibility molecule), It can be made to add to the 3'-end of DNA using single ribonucleotide terminal deoxynucleotidyl transferase.

A joining segment with biotin or imino biotin (imino-biotinyl) (b) Formula- $\text{NH}(\text{CH}_2)_{aa}\text{NH}(\text{PO}_2)\text{O}^-$ , Formula- $\text{NH}(\text{CH}_2)_{bb}\text{SS}(\text{CH}_2)_{cc}\text{NH}(\text{PO}_2)\text{O}^-$ , Or what was connected with 5'-carbon of a 5'-nucleotide of replicative form RNA through a spacer group of formula- $\text{NH}(\text{CH}_2)_{bb}(\text{CO})(\text{NH})(\text{CH}_2)_{cc}\text{NH}(\text{PO}_2)\text{O}^-$ , and here, respectively, An amide phosphate group has combined a

5'-nucleotide and an amino group with biotin or imino biotin, and aa of 2 to 20, and bb and cc is the same, or are a different intermediary cage and each 2-20. \*\*\*\*\* RNA with a spacer group of formula- $\text{NH}(\text{CO}_2)_{aa}\text{NH}(\text{PO}_2)\text{O}^-$  is compoundable in accordance with Chu, Orgel, DNA, four volumes, and a 327 - 331 pages (1985) method. \*\*\*\*\* RNA with a spacer group of formula- $\text{NH}(\text{CH}_2)_{bb}\text{SS}(\text{CH}_2)_{cc}\text{NH}(\text{PO}_2)\text{O}^-$  is explained to Example I. \*\*\*\*\* RNA with a spacer group of formula- $\text{NH}(\text{CH}_2)_{bb}(\text{CO})(\text{NH})(\text{CH}_2)_{cc}\text{NH}(\text{PO}_2)\text{O}^-$ , Replicative form RNA, It is compounded by making it react to a formula- $\text{O}(\text{PO}_2)\text{NH}(\text{CH}_2)_{cc}\text{NH}_2$  group combined with 5'-carbon of a 5'-nucleotide, and active ester of aminocarboxylic acid of formula  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_{bb}\text{CO}_2\text{H}$ . A reaction of N-hydroxy SUKUSHIN iminoester (N-hydroxysuccinimino) of biotin which makes \*\* biotin amide or an imino biotin amide bond with the 1st class amino group generate, or imino biotin is known in a technical field.

It is explained by example.

(c) Are a thing of an amino group joining segment connected via a spacer group of formula- $(\text{CH}_2)_{aa}(\text{NH})(\text{PO}_2)\text{O}^-$  or  $(\text{CH}_2)_{bb}\text{SS}(\text{CH}_2)_{cc}\text{NH}(\text{PO}_2)\text{O}^-$ , and here an amide phosphate group, It has combined with 5'-carbon of a 5'-nucleotide of replicative form RNA.

aa, bb, and cc are defined as mentioned above.

A method of Chu, Orgel, DNA, four volumes, 327 - 331 pages, and the following Examples I is used for preparation of such replicative form RNA.

(d) It is a thing of a sulfur joining segment united by a spacer group of formula- $(\text{CH}_2)_{cc}\text{NH}(\text{PO}_2)\text{O}^-$ , and an amide phosphate group is combined with 5'-carbon of a 5'-nucleotide of replicative form RNA here, and cc is defined as mentioned above. Example I and X explain composition of

\*\*\*\*\* RNA with such a joining segment and a spacer group.

A joining segment of avidin or streptoavidin, and an example of a combination between replicative form RNA non-“sharing” Avidin. Or streptoavidin forms biotin or imino biotin, and a complex (only an un-sharing interaction [ a complex described here ] is \*\*\*\* intermediary \*\*\*\*), This biotin or imino biotin will combine with 5'-carbon of a 5'-nucleotide of replicative form RNA by one of the spacer groups who stated previously, and biotin or imino biotin will be combined with replicative form RNA in share.

The covalent bond with a joining segment can be made to form about the compatibility molecule of nucleic acid via the various atoms of 5'-carbon of a 5'-nucleotide, 3'-carbon of a 3'-nucleotide, pyrimidine, or a purine base. A joining segment is a nucleotide of 3' of the nucleic acid fragment of the fragment of a \*\*\*\*\* nature child with the arrangement of the fragment of a sample, and complementary arrangement elongated from 3'- and a 5'-end, respectively, or less than 5'. For example via one of the above-mentioned spacer groups, probably, a joining segment is biotin or imino biotin combined with 5'-carbon of the 5'-nucleotide of a compatibility molecule, or a sulfur atom, as it combines with 5' carbon of the 5'-nucleotide of replicative form RNA. In the portion of nucleic-acid-affinity molecules other than a fragment with as complementary by that cause in a biotin joining segment (there are also two or more things) arrangement as the arrangement of the fragment of a sample which a compatibility molecule hybridizes in a sample, It may have combined with 5-carbon of uracil (uracil) residue (there are also two or more things), 8-carbon of adenine (adenine) residue (there are also two or more things), or 6-carbon via various kinds of spacer arms. For example, refer to Ruth, patent association treaty public-relations No.84/03285;Brakel and Starvianopoulous, and European Patent application public-relations No.0122614. . As [ make / suitable compatibility especially over the sample of a compatibility molecule for a compatibility molecule / lose about replicative form RNA ] The preparing method of the \*\*\*\*\* nature child with many joining segments, spacer groups, and other still such joining segments and spacer groups, etc. are known in the technical field.

About an antibody, an antigen, or the compatibility molecule of lectin. Many joining segments (for example, a nucleic acid fragment, a sulfur atom, etc. which are used for the hybridization of biotin and replicative form RNA), and the suitable method of carrying out the covalent bond of them to a compatibility molecule via a direct or spacer group are known in the technical field. For example, many antibodies and lectins by which the biotinylate was carried out can be purchased.

Intermediary \*\*\*\*\* to which, as for one example of the combination between connection residue like avidin or streptoavidin, and an antibody, an antigen or a lectin affinity molecule non-“sharing” , avidin or streptoavidin attaches biotin, imino biotin, and a complex.

\*\* and a compatibility molecule -- un-sharing -- it connects-like or in share.

For example, an antibody affinity molecule can be made to combine biotin with anti-- antibody which carried out the biotinylate, or the Staphylococcus protein A which carried out the biotinylate in un-sharing by making the complex of an antibody affinity molecule form as understood in the technical field.

As \*\*\*\* information in art, about the method of combining connection residue with protein or nucleic acid, For example, Dreyer, Dervan, Proc.Natl.Acad.Sci.(U. S.A.) 82 volume, 968 - 972 pages (1985); Forster et al., Nucl.Acids, Res.13 volume, 745 -761-page (1984); -- Ward et al. and European Patent application public-relations No.0063879; -- Englehardt et al.. European Patent application public-relations No.0097373;Alagon, King, 19 Biochemistr(ies), 4341 - 4345 pages (1980); refer to Imam et al., Cnacer Res.45 volume, and 263 - 271 pages (1985).

The 2nd joining segment combined with the 1st joining segment combined with replicative form RNA, and the compatibility molecule, (Two like [ of the nucleotide elongated from the 3'-end of the nucleic-acid-affinity molecule combined with phosphoric acid of the disulfide residue formed from

a sulfur atom joining segment, and the 5'-end of replicative form RNA ]) Carry out a covalent bond mutually or, or (the antigen combined with the biotin combined with avidin or streptoavidin, imino biotin, and a corresponding antibody.) Or combination between replicative form RNA and a compatibility molecule is formed by interacting in un-sharing mutually as a specific bonded pair like the enzyme inhibitor combined with the enzyme.

As shown previously, one example of the covalent bond between a compatibility molecule and replicative form RNA in while a compatibility molecule is compounded by in vitro one. Or T4 RNA ligase is used next, using terminal deoxynucleotidyl transferase, While combining replicative form RNA with the extension 3'-end of a pudding (one or more than it) via 5' end, it is combination formed via the extension pudding residue added to the 3'-end of the DNA compatibility molecule. In order to advance addition to replicative form RNA efficiently, the purine nucleotide in the 3'-end of this joining segment should be ribonucleotide as understood in the technical field. When the activity of this cannot be carried out as a mold of an RNA replicase after such a compatibility molecule-replicative form RNA hybrid combines with a sample, A phosphodiester bond can be made to be able to cleave by beta-desorption to an acid depurination reaction and the next, RNA can be made to be able to dissociate from DNA, and it can use as a mold of replicase there.

There are some which combine a RNA compatibility molecule with one of ends of replicative form RNA in other examples using T4 RNA ligase. Such a molecule is prepared so that it may have some ribonucleotides between replicative form RNA, and a sample and a fragment of a compatibility molecule to hybridize. If compatibility molecule RNA has added RNA obtained as a result to a 5'-end of replicative form RNA, it can serve as a mold of an RNA replicase in itself. When RNA obtained as a result does not serve as a mold of replicase, a compatibility molecule portion is made to dissociate from a replicative form RNA part, and makes replicative form RNA emit. Oligo deoxyribo NUREOCHIDO in which such \*\*\*\* has a fragment between compatibility molecule portions first hybridized in a replicative form molecule and a sample, and complementary arrangement, A molecule is made to hybridize (after making a sample hybridize or making a sample hybridize). It is made to cleave using ribonuclease H which cuts RNA specifically in a position which separates by what (or it dissolves) is heated, next RNA hybridizes with DNA. Refer to Donis-Keller, Nucl.Acids Res.7 volume, and 179 - 192 pages (1979).

A "smart probe" is in a compatibility molecule-replicative form RNA hybrid compound (namely, compound which a compatibility molecule has combined with replicative form RNA) according to this invention. A compatibility molecule is nucleic acid and the 2nd joining segment is carrying out the covalent bond of the "smart probe" to a compatibility molecule, It is the compatibility molecule-replicative form RNA hybrid molecule in which the 1st joining segment is carrying out the covalent bond to replicative form RNA, and the further 1st and the 2nd joining segment are carrying out the covalent bond mutually (that is, it is share-like [ all the combination between two joining segments ] except for combination by the secondary tertiary structure). Furthermore with a smart probe, the 1st which has combined two with a compatibility molecule, the 2nd joining segment, and any portions which have combined these two joining segments further ideally, If a compatibility molecule portion has hybridized in a sample, or only while carrying out, replicative form RNA of a hybrid molecule is that of intermediary \*\*\*\* [ as ] reproduced by RNA polymerase of a RNA dependency. " [ in short, / a probe / since this probe detects possible by combining with a sample in itself ].

It is a thing of recombination replicative form RNA containing a fragment with ribonucleotide of about 10 to 30 with as complementary [ example / one / of a \*\*\*\*\* smart probe ] in a replicative form RNA part arrangement as arrangement of a 3'-end fragment of a compatibility molecule portion short to this invention. this recombination replicative form RNA -- Miel et al. -- previously -- quotation and Kramer (Kramer) et al., and American patent application serial number No.614,350

-- previously -- a method of quotation \*\* -- therefore, it compounds. Typically, from about 75, a compatibility molecule portion is the length of 150 nucleotides, and this, It is longer than a portion with arrangement of a portion rearranged by replicative form RNA part, and complementary arrangement a little, and this is further compounded by either many known in vitro one or a method of in vivo in a technical field. 5'-carbon of a 5'-nucleotide of recombination replicative form RNA, and 5'-carbon of a 5'-nucleotide of a compatibility molecule portion, It is made to join together in a smart probe by a portion of formula- $O(PO_2)NH(CH_2)_aSS(CH_2)_bNH(PO_2)O-$  in accordance with Example I and a method of X. b is the same as a, or differs from each other, and is 2 to 20 here, respectively. When some compatibility molecule portions have not combined with stability more with other things in such a smart probe (substantially such combination in a specific combination with a sample.) Or it is intermediary \*\*\*\* as only a nonspecific combination came out and a 3'-end of a certain compatibility molecule portion was hybridized with a recombination RNA part. If hybridization with nucleic acid of a sample is performed first and then a solution of ribonuclease H is added when using a probe, A smart probe with which a compatibility molecule portion has not dissociated from a replicative form RNA part, Cleavage of a replicative form RNA part and loss of replication ability start (). [ Doonis-Keller (1979) and ] refer to quotation previously --; -- in order to remove a smart probe which has not been combined with the next, short washing is performed, and further, a compatibility molecule portion so that replicative form RNA may not receive cleavage by ribonuclease H, A disulfide bond is cleft by dithiothreitol (dithiothreitol) at; and the last which reduce quantity of a smart probe which dissociated from replicative form RNA and caused striped intermediary \*\*\*\* and a little nonspecific combination, After making replicative form RNA dissociate from a compatibility molecule, it detects by reproducing RNA and detecting reproduced RNA.

In another example of a smart probe of this invention, cleavage by ribonuclease H is not needed for inactivating replicative form RNA of a probe which has not been hybridized with a target. In this example, 5'-carbon of a 5'-nucleotide of a compatibility molecule portion, It has combined with 5'-carbon of a 5'-nucleotide of a replicative form RNA part by a portion of formula- $O(PO_2)NH(CH_2)_aSS(CH_2)_bNH(PO_2)O-$  like other examples. Any replicative form RNA can be used in this example. It is not necessary to prepare recombination replicative form RNA corresponding to a compatibility molecule portion. However, in this example a compatibility molecule portion, i.e., a "sample-joint" portion which consists of about 50 to 150 nucleotides under complementary arrangement a partial sequence of a sample which a compatibility molecule hybridizes, which comprises the following three portions intrinsically; from a 5'-nucleotide of a compatibility molecule. "5'-clamp (clamp)" which develops to a 5'-nucleotide of a sample connecting part (however, this portion is not included), and consists of about 30 to 60 nucleotides under arrangement of a portion of replicative form RNA, and complementary arrangement -- partial; -- and, From a 3'-nucleotide (however, this portion is not included) of a sample-connecting part. It is a "3'-clamp" portion which consists of about 30 to 60 nucleotides under a portion of replicative form RNA close to a 5'-end of replicative form RNA, and complementary arrangement further rather than a portion which is elongated to a 3'-nucleotide of a compatibility molecule and a 5'-clamp part of a compatibility molecule hybridizes.

In this embodiment by the method known in the technical field, inosine can replace at least some guanosine bases of the 5'-clamp part of a compatibility molecule and a 3'-clamp part, and the replicative form RNA part to hybridize optionally. This effect is making replicative form (it has not clamped) RNA the activity as a mold of a duplicate, being these plurality type RNA part, stabilizing a DNA-RNA base pair further, and making a RNA-RNA base pair unstable conversely. The compatibility molecule of this example is compounded by known in vitro one or the method of in

vivo like other cases. connection into the compatibility molecule portion of a replicative form RNA part -- Example I and X -- therefore, it carries out. In this example, while the both sides of the 3'-clamp part of a compatibility molecule and a 5'-clamp part have hybridized to replicative form RNA, replicative form RNA "is clamped" by the non-replicative form, and is inertness as a mold of a duplicate. Once a smart probe encounters with one or what thing in which a compatibility molecule portion carries out intermediary combination also of sufficient stability as other clamp parts dissociate from replicative form RNA it is (it is only a sample intrinsically), a duplicate will only become possible with RNA and a detectable form will be taken. performing hybridization with the nucleic acid of introduction and a sample first, next removing the \*\*\*\* smart probe which has not carried out intermediary combination for short washing when using the example of the smart probe of this invention, -- further -- on the other hand -- or both clamp parts are isolated from replicative form RNA. After decreasing the smart probe which carried out a little nonspecific combination, cleaving a disulfide bond by dithiothreitol and making replicative form RNA dissociate from a compatibility molecule finally, it detects by detecting RNA which was made to reproduce RNA and was reproduced optionally.

The signal produced from replicative form RNA combined with the part which does not contain a sample nonspecific, Since it will decrease if the smart probe according to this invention is used, the necessity for prolonged washing after the hybridization for acquiring a comparatively low background, Compared with the typical nucleic-acid-probe hybridization assay performed in the technical field now, it will become small by the assay using such a probe.

Although it is that those who became skilled in the art of immunoassay or nucleic-acid-probe hybridization assay can understand, Unescapable "nonspecific combination" of the compatibility molecule which produces a "background", and replicative form RNA (the RNA part or the first connection residue portion is passed) is removed, Make a required combination cause and the step of washing so that only replicative form RNA connected (combining with a compatibility molecule or continuing joining together) may merely exist in a sample at an assay system after \*\*\*\*\*, By the process of consisting of a duplicate using the RNA polymerase of a RNA dependency, replicative form RNA applies the system to the conditions which become detectable.

To the present invention, in therefore, when assaying, while having combined with the compatibility molecule replicative form RNA combined with the compatibility molecule which was combined or has been combined with the sample under assay. Or and it is required to be reproduced by the RNA dependent RNA polymerase and to sell to either after dissociating. Although various kinds of methods into which replicative form RNA is made to separate from a compatibility molecule were described previously, in it, the method of cutting reductively the disulfide bond of a between in the joining segment which is combining replicative form RNA with the compatibility molecule is contained.

A method of reproducing replicative form RNA by an RNA dependent RNA polymerase is known in a technical field. Generally, among suitable drainage system buffer solution containing four ribonucleoside 5'-triphosphoric acid, ATP, CPT, GTP, and UTP, it must only mix with an enzyme and RNA must incubate at a suitable temperature. An example explains conditions which reproduce using Qbeta replicase which is an enzyme liked. Kramer et al., M.Mol.Biol.89 volume, and 719 -736-page (1974);Kramer U.S. patent application public-relations No.614,350; -- Miel et al. (1983) -- refer to quotation etc. previously.

As an exception method, replicative form RNA which dissociated from a compatibility molecule can be combined with a carrier like an ECTEOLA paper which just carried out electrification (Saris et al., Nucl.Acids.Res.10 volume, 4831 - 4843 pages (1982)). Such a carrier that replicative form RNA combined with four ribonucleoside 5'-triphosphoric acid using suitable buffer solution A basis of a suitable temperature, If a solution of an RNA replicase (RNR dependency RNA polymerase) is made

suspended (that is, they are the intrinsically same conditions as having used for a duplicate of the liquid phase) then, a duplicate of RNA combined with a carrier will occur. Refer to Saris above-mentioned (1982); and Bresser et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.(U. S.A.)* 80 volume, and 6523 – 6527 pages (1983). Replicative form RNA has been combined with a carrier which just carried out electrification in detection of simple RNA.

Replicative form RNA is detectable by a way many differ.

Ultraviolet absorption of replicative form RNA can perform detection like the contact light printing method (Kutateladze et al., *Anal.Biochem.*100 volume, 129 – 135 pages (1979)), for example.

By using ribonucleoside 5'-triphosphoric acid (for example, 3H label, an alpha-<sup>32</sup>PO<sub>4</sub>-label, etc.)

which carried out the sign by radioactivity during duplicate reactions so that reproduced RNA may have radioactivity, Reproduced RNA is detectable using either of many known methods by the radioactivity.

. Biotin or imino biotin can be made full for replicative form RNA. this is detectable as enzyme-avidin which combines with biotin which RNA combined using further known art, and carries out the catalyst of the generation of easily detectable coloring matter, or an enzyme-streptoavidin addition. Matthews above-mentioned (1985); — Leary et al. (1983) and above-mentioned; — Ward et al. and above-mentioned; — refer to Englehardt et al. and \*\*\*\*. The incorporation to replicative form RNA of biotin or imino biotin can perform UTP by which the biotinylate was carried out to carbon of the 5th place of uracil residue via a spacer by using as a substrate of replicase of duplicate reactions. Such UTP is a known compound. RNA containing uracil by which such UTP became a substrate of Qbeta replicase and the biotinylate was further carried out via a spacer group who combined with carbon of the 5th place. Since such UTP was used for the composition, becoming a mold of a duplicate in which Qbeta replicase carries out a catalyst is known.

RNA produced as a result of the processes of a duplicate Forster \*\*\*\* (1985), in accordance with \*\*\*\*\*, a biotinylate can be carried out using optical biotin acetic acid — further — next, it is detectable using the system of an avidin enzyme addition-chromogen compound like replicative form RNA which carried out \*\*\*\*\* composition of the UTP which carried out the biotinylate in duplicate reactions.

RNA produced as a result of duplicate processes can give fluorescence by adding the nucleic acid which carried out fluorescence ornamentation to 3' end of replicative form RNA using the reaction in which T4 RNA ligase carries out a catalyst. Refer to Cosstick et al., *Nucl.Acids*.12 volume, and 1791 – 1810 pages (1984). The fluorescence of RNA obtained as a result can be used for detection of RNA by either of the standard art of when.

In the method of further others of using for detection of reproduced RNA, the acceptor material specifically combined with nucleic acid in the system in which reproduction is performed. Or it adds to media, such as a carrier like the ECTEOLA paper with which replicative form RNA isolates which just carried out electrification, and there are some which measure the signal produced from acceptor material. a chromogen color (Dahlberg et al.) like : "stain oar (Stains all)" by which the following are contained in such a substance *J. Mol.Biol.*41 volume and 139–147 page (1969); methylene blue (Dingman, Peacock, and *Biochemistry* — seven volumes) 659 – 668 pages (1968), and the argentation (Sammons et al.) *Electrophoresis*, two volumes, 135 – 141 pages (1981), the fluorescence field compound (Sharp et al.) combined with RNA, such as Igloi, *Anal. Biochem.*134 volume, and 184 –188–page (1983);, for example, an ethidium bromide etc. *Biochemistry*, 12 volumes, 3055 – 3063 pages (1973); Bailey, Davidson, *Anal.Biochem.*70 volume, 75 –85–page (1976); — The fluorescence field compound specifically combined with RNA used as the molds of the duplicate by Qbeta replicase .... the FUIKOBIRI protein (phycobiliprotein) (Oi et al.) of for example, Qbeta replicase which carries out conjugate to an infection subunit *J. Cell Biol*, 93 volumes, 981 –

986 pages (1982). It is Stryer et al. and United States patent No.4,520,110 etc.

concentration of replicase -- a dark degree of template RNA -- also falling -- if it assumes that it is still deep and restriction of concentration of ribonucleoside 5'-triphosphoric acid is not received further, concentration of template RNA will increase in logarithm with time during a duplicate of RNA by a catalyst of replicase -- I will come out. After \*\* which is exceeded and carried out and for which becomes equal to concentration of replicase, or concentration of template RNA waits, unless restriction of concentration of ribonucleoside 5'-triphosphoric acid is received, concentration of template RNA will increase to time linearly. For example, refer to Kramer \*\*\*\* (1974).

Under conditions of a duplicate by a replicase catalyst specified as Example I, every 36 seconds, and upper time intermediary striped \*\*\*\*\* is finally shown for concentration of a mold in concentration of an enzyme. [ MDV-1 RNA ] [ the concentration ] [ twice ]

By the duplicate system of reaction by a replicase catalyst, concentration of template RNA after fixed reaction time will be related to initial concentration of template RNA. If it assumes throughout duplicate reactions that it is what has concentration of replicase higher than concentration of a mold, Probably, logarithm of concentration of template RNA at the time of ending reaction is proportional to initial concentration logarithm (at the reaction start time) of a mold directly, (if restriction of concentration of ribonucleoside 5'-triphosphoric acid is not received further).

Concentration of replicase is lower than concentration of a mold, and after \*\*\*\*\*, unless restriction of concentration of ribonucleoside 5'-triphosphoric acid is received, concentration of a mold at the time of ending reaction is proportional to logarithm of initial concentration of a mold directly. Reaction time taken for concentration of a mold to become equal to concentration of replicase is proportional to negative logarithm of initial concentration of a mold.

Still bigger sensitivity can be obtained by advancing duplicate reactions more for a long time.

In assay according to this invention, it assays simultaneously under the same possible conditions about a test sample of both sides of a sample and a control sample which are examining a sample.

It is made for a control sample to become the same thing as a test sample except a point which does not contain a sample or contains a sample of a known quantity as understood in a technical field. Control which does not contain a sample is a "background" and it is impossible for distinguishing a sample containing a sample and a sample which is not included at the time not more than it. A level more than a background can determine existence of a sample in a test sample by measuring quantity or concentration of replicative form RNA reproduced by assay of a test sample with quantity of a control sample or concentration assayed simultaneously. When a control sample which added a sample of a known density range is used, concentration of a sample in a test sample can be guessed.

Here, an example describes this invention further extensively.

Example 1 This example holds activity in combination to biotin and middle variety RNA (referred to as "MDV-1" RNA) of avidin (to next) as a mold [ as opposed to Qbeta RNA polymerase in this RNA ], and the disengageable method is shown from biotin or biotin + avidin. For the capability to combine with avidin specifically via a biotin avidin specific binding pear, . An avidin skeleton is combined and deal in MDV-1 RNA only with biotin. (Passing biotin directly combined for example, with this compatibility molecule in person) It becomes a universal reporter also to which compatibility molecule, and the capability to combine with a target organism polymer sample of a compatibility molecule specifically is not spoiled in that case. For the capability (it originates in a specific binding pear between biotin and avidin) to combine with biotin specifically, Although MDV-1 RNA which combined biotin and avidin (what carried out complex formation to biotin) is used as a universal reporter also to which compatibility molecule by which a biotin skeleton is combined and in which it deals and being got, The capability to combine with a target organism



polymer sample of capability or this compatibility molecule specifically combined with avidin of a biotin skeleton itself [ this ] in that case specifically is not spoiled. (Avidin has four biotin reaction student parts, and, so, can serve as a Nakama constituent called biotin avidin biotin combination.) MDV-1 RNA has the same arrangement as a middle variety RNA variant shown in meal (Miele) et al., J.Mol.Biol.171 volume, and 281 – 295 pages (1983), and there is the next point of difference. 43 place C of arrangement of meals is changed into U in MDV-1 RNA. 61 place A of arrangement of meals is changed into G in MDV-1 RNA. 105 place A in arrangement of meals is changed into U in MDV-1 RNA. 134 place C of arrangement of meals is changed into U in MDV-1 RNA. 135 place G in arrangement of meals is changed into the last in MDV-1 RNA sequence at A. Although a specific RNA variant with arrangement described now was used in this example and other examples of this specification, this variant was only used from a reason for being available simple in a supply surface. some RNA ("wild type" middle variety RNA.) used as a mold to a duplicate in vitro [ by this Qbeta replicase ] A variant of different middle variety RNA from MDV-1 RNA, mini variety RNA, a thing holding capability to receive a duplicate by this Qbeta replicase in a test tube by other varieties or a mutant of one of the above as which a name has not been determined yet although one of micro variety RNA and the nano variety RNA and identification are carried out — also containing — it is used and gets.

For remarkable stability in in vitro [ the ], although QbetaRNA-dependence student RNA polymerase is the suitable replicase to this invention, there is other RNA-dependency RNA polymerase known in art of it being used and getting, and this is dramatically large in RNA which the polymerase recognizes as a mold to a duplicate and which can be reproduced. SP replicase and MS2 replicase are contained in an enzyme besides these.

A process of a series [ RNA / which is obtained by enzymatic synthesis using Qbeta replicase / 5'-<sub>ppp</sub>MDV-1(+)];

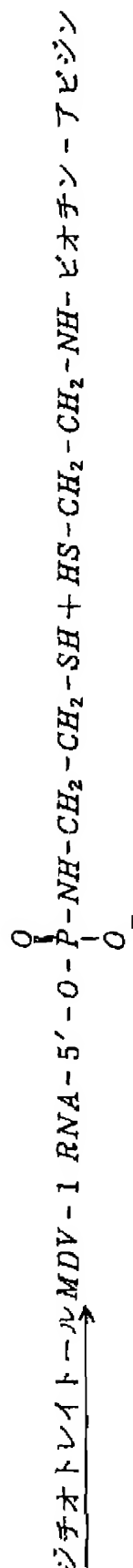
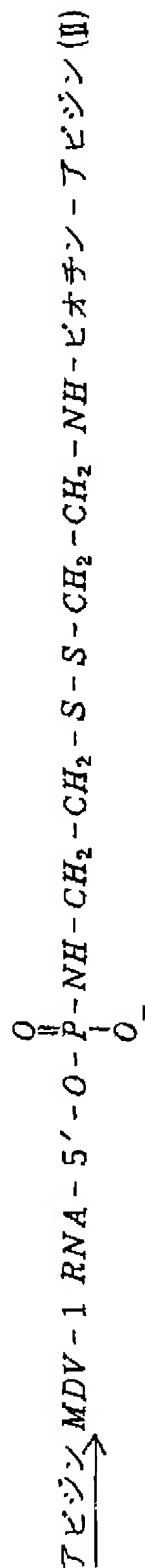
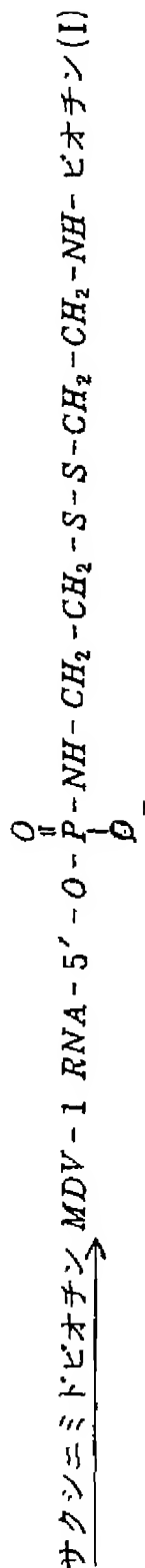
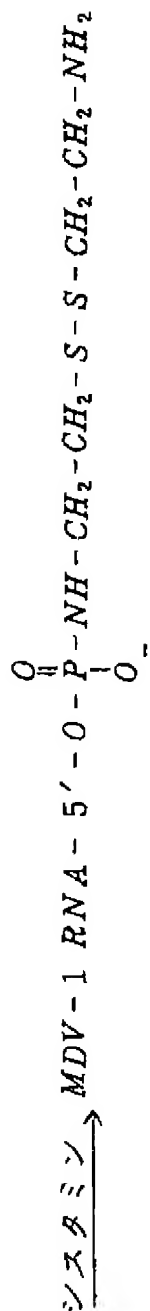
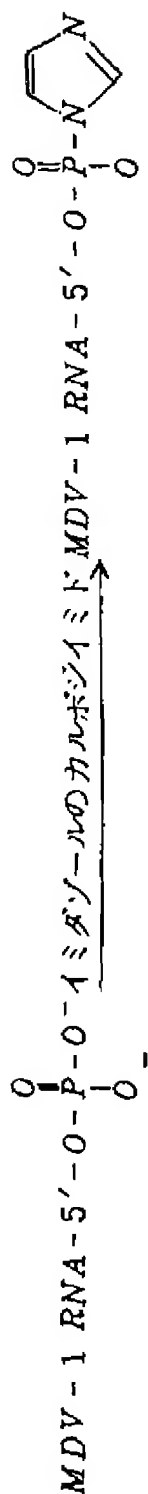
1) 5'-end 3 phosphate group is removed by incubation with calf intestines ARUKARU phosphatase, [Gamma <sup>32</sup>P] It was changed to 5'-end 1 phosphoric acid by an incubation with ATP and T4 polynucleotide kinase.;

2) 5'-phosphoro imidazole groups are a coupling reagent and the 1-ethyl- 3. – [3-dimethylaminopropyl] It was compounded by condensation with bottom imidazole of existence of a carbodiimide.;

3) This imidazole group was converted into a cystamine group by incubation with cystamine dihydrochloride.;

Biotin 4) A biotinylate reagent, ; and 5 avidin which were combined with cystamine by incubation with N-hydroxy SAKUSHINIMIDO biotin were converted more by 5'-biotinylate MDV-1(+) RNA-avidin addition for an incubation with avidin having combined with a 5'-biotin group. A 6 this 5'-biotinylate MDV-1 RNA-avidin addition was separated from an intermediate which carried out the partial reaction by acrylamide gel electrophoresis. The first four processes of the following reaction formula summarize the above-mentioned processes 2-5. :





The 5th process shown in a formula shows reductive cleavage of disulfide of a cystamine skeleton for separating RNA from biotin avidin so that it may state below.

Mobility on electrophoresis of RNA-biotin avidin addition (II) is low and \*\* from mobility of 5'-biotinylate RNA precursor (I) because of the size.

Quantity (determined by measuring radioactivity in a band of each gel) of a formed RNA-biotin avidin addition increased asymptotically as a function of avidin concentration, and received the maximum with 25 to 35% of a formation addition. :1 this 5'-cystamine MDV-1 RNA identification of RNA-biotin avidin addition (II) was confirmed to be by three methods incubates with avidin, Mobility on electrophoresis of output was identified it of unreacted contrast, and it was shown that an addition in a late move band is not a non-biotinylate precursor.;

2) Similarly this 5'-phosphorylation MDV-1 RNA reacts to a biotinylate reagent, each of refining by electrophoresis and incubation with avidin should do -- the mobility is the same as -- \*\*\*\*\*; and 3, although these not less than 80% of additions in which it is eluted from a band of late mobility had combined with biotinylate agarose, In the case of contrast containing 5'-cystamine, it is 10% or less, and is \*\*\*\*\*.

As a still more detailed description, combination to a 5'-end of biotin and MDV-1(+) RNA of avidin and identification of this addition, using material -- a following method -- therefore, :enzyme and a compound which were performed -- :calf intestines alkaline phosphatase (Worringer Mannheim bio-chemicals.) by which the following were purchased [ ] the Indian police, the State of Indiana, the U.S., and bacteriophage T4 polynucleotide kinase (Pharmacia P-L bio-chemicals.) a pith KIYATA way, New Jersey, U.S.; ribonuclease T1, and high polymerization yeast RNA (KIYARUBAIKEMU\*\* Bering.) San Diego, California, and U.S.;N-hydroxy SAKUSHINIMIDO biotin (a sigma cay cull company.) St. Louis, Missouri, and U.S.;2,2'-dithiobis(ethylamine)-dihydrochloride (CTC ogre Knicks, Atlanta, Georgia, U.S.);1-ethyl- 3 - [3-dimethylaminopropyl] carbodiimide (Aldrich chemical company, Milwaukee, Wisconsin, U.S.); -- biotinylation agarose (8-mg avidin / ml combination) and avidin DN(vector, RAPORATO lease, Burlingame, California, U.S.); -- and [Gamma <sup>32</sup>P] ATP -- and [Alpha <sup>32</sup>P] GTP (Amersham, Arlington Heights and Illinois, U.S.). Qbeta RNA replicase -- yaw young people (Eoyang) and HOGASUTO (August) (literature.) it will be based on edit of Nucleic Acid Research, G.L. Cantoni (Cantoni), and D.R. Davies (Davies) in yaw young people and (1971) (a Harper and low.) By operation of operation in New York, the 2nd volume, and 829-839 pages, it was isolated from the BAKUTERI-off horse mackerel Qbeta infection Escherichia coli stock Q13, and a process of this hydroxyapatite was skipped.

Adjustment of MDV-1(+) RNA Easily, a variant of middle variety RNA in which identification and isolation are possible (refer to it Kramer (Kramer) et al., J.Mol.Biol.89 volume, 719 - 736 pages, and 974 years) is used in an example, and is mentioned as "MDV-1 RNA" here. This arrangement is mentioned above.MDV-1 RNA of 758microg a MDV-1(+) RNA variant mold of 705ng, and Qbeta replicase of 69microg, It was compounded by incubating by pH 7.5 for 210 minutes and among 1 ml which contains 1mM ATP, 1mM CPT, 1mM GTP, 1mM UTP, 15mM MgCl<sub>2</sub>, and the 100mM tris-HCl at 37 \*\*. extraction (Methods in Enzymology.) next according [ this incubation mixture ] to phenol L. edit (Academic Press.) by Grossman (Grossman) and the K. Maldiv Islands (Moldave) Deprotein was carried out by the KS. kaavie (Kirby) in New York, 12 volumes, the part B, 87 - 100 pages, and 1968, and this RNA isolated by precipitation which uses double the amount of ethanol at -20 \*\* under 2M ammonium acetate existence. MDV-1 (+) RNA was separated from MDV-1(-) RNA by bottom acrylamide gel electrophoresis of 1mM MgCl<sub>2</sub> existence (D. R. Mills (mills) et al., a cell, 15 volumes, 541 - 560 pages, 1978).

Analysis of chemical modification RNA, and an isolation RNA intermediate, 100mM NaCl, 1mM EDTA, and 10mM HEPESU (pH 7.5) [T. Maniatis et al. (maniatis), Molecular Cloning : A laboratory manual, a cold spring harbor press, It was isolated from a reaction mixture by a spin column chromatography which lets the sephadex G-50 (Pharmacia P-L biochemicals) made to equilibrate

in a cold spring harbor, New York State, and 1982] pass. RNA precipitated from a solution by double the amount of ethanol addition at  $-20^{\circ}\text{C}$  under 100mM NaCl existence. Electrophoresis was performed on the 1-mm-thick 6% polyacrylamide gel added and developed in 90mM tris-boric acid and pH 8.3 and 1 mM EDTA. Denatured gel contained urea of 7M again. Before electrophoresis on denatured gel, among 7M urea, at  $90^{\circ}\text{C}$ , it was dissolved by heating for 1 minute, and RNA was cooled immediately. An autoradiograph of gel was obtained by exposing to a Kodak X-OMATSUTO AR film at  $-80^{\circ}\text{C}$  under the E. I. du Pont de Nemours Rhizopus nigricans TSUKUSU lightening plus (Dupont Cronex Lightnig Plus) intensifying screen existence (or nonexistence). As for RNA, 500mM ammonium acetate and pH 7.5 and 1 mM EDTA (T. Maniatis et al., the above-mentioned) were eluted from gel.

Dephosphorization of 5'-<sub>ppp</sub>MDV-1(+) RNA This 5'-end triphosphate group is 50 \*\* for MDV-1(+) RNA of 2microg to 0.7EU calf intestines alkaline phosphatase, and 30 minutes. It was removed by incubating in the 50mM tris- HCl of 50microl, pH 8, and 100microM EDTA. 0.7EU calf intestines alkaline phosphatase was added to the pan, and this incubation was continued for 30 more minutes. This reaction vacated this incubation mixture into 100mM NaCl and 2% sodium dodecyl sulfate, and stopped by heating this at  $60^{\circ}\text{C}$  for 15 minutes. this solution -- the next -- phenol: -- deprotein was carried out by extracting twice (T. Maniatis et al., the above-mentioned) with chloroform under chloroform (1:1). This dephosphorization MDV-1 RNA isolated by precipitation by ethanol next.

5'- $^{32}\text{P}$  phosphorylation of MDV-1 RNA Dephosphorization MDV-1 RNA of 2microg was 50 \*\* for 3 minutes, it incubated in 10mM tris-HCl20microl (pH 7.5), 1mM spermidine, and 100microM EDTA, and ranked second, and was cooled promptly. This capacity is 12.2p mol next. [Gamma  $^{32}\text{P}$ ] It was referred to as 40microl using the buffer solution set to  $\text{MgCl}_2$  10mM, dithiothreitol 1mM, and tris-HCl 50mM (pH 7.5) by ATP (300 Ci/mol) and 30EUT4 polynucleotide kinase and the last concentration. This solution stopped by incubating at  $37^{\circ}\text{C}$  for 75 minutes, and vacating this mixture for 20mM EDTA. Phenol of tales doses [ kinase / this ]: It was extracted by chloroform (1:1) and this phosphorylation MDV-1 RNA isolated by precipitation which uses ethanol. This RNA was further refined by reprecipitation by the spin column chromatography which lets the sephadex G-50 pass, and the ethanol following it, and, subsequently to the inside of 1 mM EDTA-NaOH (pH 8), slurring was carried out.

Conversion to 5'-cystamine MDV-1 RNA of MDV-1 RNA 2microg [5'- $^{32}\text{P}$ ] MDV-1 RNA and high polymerization yeast RNA (that by which dephosphorization was beforehand carried out by incubating at  $50^{\circ}\text{C}$  for 1 hour with yeast RNA of 180microg and calf intestines alkaline phosphatase of 50EU) of 16microg For 3 minutes, At  $50^{\circ}\text{C}$ , it incubated in 1 mM EDTA-NaOH (pH 8) of 20microl, and, subsequently was cooled immediately. 1M imidazole (pH 6) of 25microl, and 1.5M 1-ethyl- 3 of 2.5microl - [3-dimethylaminopropyl] A carbodiimide was added to the next and this mixture incubated at  $23^{\circ}\text{C}$  for 1 hour. RNA was isolated from this mixture by a spin column chromatography which lets the sephadex G-50 pass. [5'- $^{32}\text{P}$ ] 5'-imidazo RAIDO of MDV-1 RNA (un-converting) [5'- $^{32}\text{P}$ ] MDV-1 RNA -- containing -- 100mM NaCl, 1mM EDTA, and 10mM HEPESU (pH 7.5) 100 micro -- it was collected in 1. 1M2,2'-dithiobis(ECHIRAMIN)-dihydrochloride (cystamine dihydrochloride, pH 7.7) was added to the next, it was referred to as last concentration 25mM, and this solution incubated at  $50^{\circ}\text{C}$  for 1 hour. This RNA isolated with spin column chromatography which lets the sephadex G-50 pass next, and precipitated using ethanol.

Conversion to 5'-biotinylation cystamine MDV-1 RNA of 5'-cystamine MDV-1 RNA This 5'-cystamine [ $^{32}\text{P}$ ] MDV-1 RNA (un-converting) [ $^{32}\text{P}$ ] MDV-1 RNA -- containing -- it dissolved in 200mM HEPESU (pH 7.7) and 1mM EDTA 40microl, and incubated at  $23^{\circ}\text{C}$  for 40 minutes. Superfluous N-hydroxy SAKUSHINIMIDO biotin was removed by centrifugal separation, and this

RNA used ethanol next and precipitated. This 5'-biotinylation MDV-1 RNA(I) (non-biotinyllating RNA is included) was further separated from superfluous N-hydroxy SAKUSHINIMIDO biotin by electrophoresis on denatured gel. It was eluted from this gel and RNA in this  $^{32}\text{P}$ -sign band was refined by several precipitation using ethanol.

Separation from non-biotinyllating MDV-1 RNA of 5'-biotinylation MDV-1 RNA Partial 5' of 50 to 200microg - It biotinyllates. [ $^{32}\text{P}$ ] MDV-1 RNA incubated in 10mM HEPESU (pH 7.7) and 1mM EDTA at 23 \*\* for the avidin DN (high grade type of avidin purchased from a vector laboratory, Burlingame, California, and the U.S.) of 2 to 10microg, and 45 minutes. This 5'-biotinylation [ $^{32}\text{P}$ ] MDV-1 RNA-avidin addition (II) is un-biotinyllating. [ $^{32}\text{P}$ ] It was separated from RNA and isolation avidin by electrophoresis on denatured gel. A this 5'-biotinylation MDV-1 RNA-avidin addition was extracted from this gel next, and precipitated using ethanol.

Identification by complex formation with biotinylation agarose of this RNA-biotin addition (II) 5' - The biotinyllate was carried out. [ $^{32}\text{P}$ ] A MDV-1 RNA-avidin addition and 5'-cystamine [ $^{32}\text{P}$ ] MDV-1 RNA flowed out of this gel, and precipitated several times using ethanol. Each addition incubated in 23 \*\*, 10mMHEPESU;pH7, and 1mM EDTA for 15 minutes with biotinyllate AGARORU 50microl. This agarose precipitated by centrifugal separation and was twice washed using buffer solution. A fraction of each radioactivity addition which precipitated with this biotinylation agarose was measured by a scintillation counter.

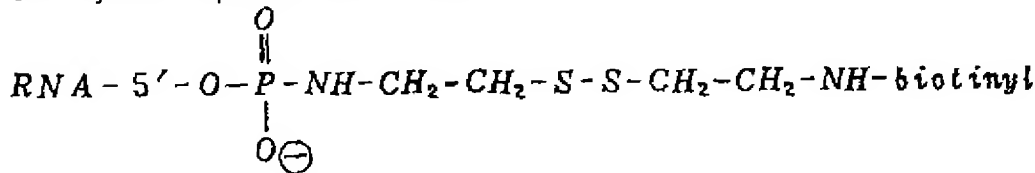
5'-thio- ethylamino MDV-1 RNA \*\* [ $^{32}\text{P}$ ] By reduction which uses dithiothreitol, a MDV-1 RNA-biotin avidin addition is 5'-thio- ethylamino. [ $^{32}\text{P}$ ] It was converted into MDV-1 RNA and a biotin avidin by-product. A 5'-biotinyllate [ $^{32}\text{P}$ ] It incubates in 23 \*\*, 100mM dithiothreitol (DTT) 30microl, 1mM EDTA, and 10mM HEPESU (pH 7.7), and a MDV-1 RNA-avidin addition cuts a disulfide bond of this spacer joint arm for 1 hour. Next, biotinyllate AGARORU 40microl is added to this reaction mixture, incubates at 23 \*\* for 1 hour, and combines a biotin avidin by-product. This biotinyllate agarose was removed from this solution by centrifugal separation.

95% of radioactivity is collected from digestive liquor, and it is checked that a disulfide bond arm has been cut. Radioactivity with which a nonreduction RNA-biotin avidin addition is not filled to 10% in biotinyllate agarose and a contrast reaction which incubates was found out in digestive liquor. Cut RNA was collected by precipitation which uses ethanol and was analyzed by electrophoresis under existence of 100microM dithiothreitol (dimerization of reduction RNA is prevented), and on nondenaturing gel. Although this 5'-thio- ethylamino MDV-1 RNA moved at the same speed as 5'-phosphorylation MDV-1 contrast RNA in a gel top, a nonreduction addition moved it at a later speed. This 5'-biotinyllate MDV-1 RNA-avidin addition (II) and this 5'-thio- ethylamino MDV-1 RNA were examined, respectively in order to see whether it is possible to act as a mold to MDV-1 RNA biosynthesis by Qbeta replicase.

This ornamentation that should be examined [ $^{32}\text{P}$ ] MDV-1 RNA each 5microg is 37 \*\*, and is 400microM ATP of 50microg, 400microM CPT, and 400microM. [ $\text{Alpha } ^{32}\text{P}$ ] It incubated in GTP (500 m Ci/m mol), 400microM UTP 12mM  $\text{MgCl}_2$ , and the 84mM tris- HCl (pH 7.5). A sample of 2microl was taken per minute between 7 minutes - 15 minutes. It adsorbed on 3MM\*\* \*\*\*\* (WATSUTOWAN) of a nunbird semi circle (23 mm in aperture), and each sample was vacated into ice-cooling 300mM phosphoric acid, 20mM sodium pyrophosphate, and a beaker containing 1mM EDTA. \*\* \*\* paper was washed 6 times using the liquid, and flowed a labeled precursor out of precipitation RNA by which the trap was carried out into fiber. \*\* \*\* paper used ethanol next, and was dried in 1-time washing and the air, and the radioactivity was measured in a scintillation counter. A result showed that both 5'-ornamentation RNA acted as a mold to Qbeta RNA replicase.

It is the same as a synthesis rate set for a contrast reaction started using 100 ng/ml non-modified MDV-1 RNA, and RNA-biosynthesis speed in each reaction is \*\*\*\*\*.

As for this example, chemical handling included in combination to MDV-1 RNA of biotin also shows that a case to 5' end biotin group of avidin does not do inhibition to enzymatic replication of this RNA sequence, either. It is the following figure that this 5'-end biotin avidin does not do inhibition to enzymatic replication of this RNA. :



It is alike, is returned to a connecting position of biotin and the length of a spacer arm which are shown, and gets. RNA biosynthesis must be started at the non-modified 3' end (A. K. banner G (Banerjee) et al., J.Mol.Biol.46 volume, 445 – 455 pages, 1969) of this mold, and more than length suitable for duplicate stops in 5' end of this mold must give this spacer arm.

Example II human gamma globulin (IgG) was isolated from a test subject who has not been infected with a test subject and B German measles which were infected with A German measles recently, and it was examined that the antiserum is netative beforehand at a reaction with a German measles antigen. In order to combine IgG in each sample with biotin, each sample is diluted by 4-mg protein / ml in borate buffered saline (pH 8.5). It dissolved into dimethylformamide (10mg/(ml)). Biotinyl N-hydroxy SAKUSHINIMIDO ester 50 microliter is added for these 1 ml of every dilution samples. At a room temperature, this reaction mixture is stirred for 2 hours, ranks second, and is dialyzed overnight to 1 l. of phosphate buffered saline per ml (PBS, pH 7.4, 4 \*\*). A solution made as a result contains biotinylate IgG, and is saved under sodium azide existence at 4 \*\*.

It has the well covered by pH 9.8 by German measles antigen among 0.1M sodium carbonate buffer solution. It incubates with biotinylate IgG content solution 50mul by which a polystyrene microtiter plate was prepared as mentioned above at a room temperature for 3 hours per well and by a dilution factor of 1:10, 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000, and 1:3000. A plate with a well which is not covered with a German measles antigen is \*\*\*\*\* (ed) as contrast. As for dilution of an IgG sample, horse serum was used 5% in PBS. This plate is washed 3 times after an incubation with a diluent of a biotinylate IgG sample using NaCl-Tween 20.

a microtiter plate -- each -- an PBS solution of MDV-1 biotin avidin addition (II) subsequently prepared like [ in the case of Example I ] is added to a well by 1-10 microg/ml concentration -- this -- a well incubates at a room temperature with this solution next for 2 hours. Next, this plate is washed 3 times using NaCl-Tween 20.

Next, 0.1M DTT in tris buffers (pH 7.5) is added to all the wells, and a mixture made as a result incubates at a room temperature for 1 hour.

each -- a well -- the next -- Qbeta replicase 4.6microg -- 37 \*\*, 400microM ATP, 400microM CPT, and 400microM [Alpha <sup>32</sup>P] GTP (500 m Ci/m mol), 400microMUTP, 12mM MgCl<sub>2</sub>, and 84mM tris-HCl(pH 7.5) 50micro -- it incubates in I. A sample of 2microl is taken per minute for 1 minute to 15 minutes. It adsorbs on 3MM\*\* \*\*\*\* (Watt Mann) of a nunbird semi circle (23 mm in aperture), and a sample of 2microeach I is vacated into ice-cooling 300mM phosphoric acid, 20mM sodium pyrophosphate, and a beaker containing 1mM EDTA. \*\* \*\* paper is washed 6 times using the liquid, and flows a labeled precursor out of precipitation RNA by which the trap was carried out into fiber. \*\* \*\* paper uses ethanol next, and is dried in 1-time washing and the air, and the radioactivity is measured in a scintillation counter. Radioactivity beyond a background suggests existence of anti-- German measles IgG in an assay blood serum.

Example III 5'-biotin \*\*\*\*\*- P-16-mer (5'-bio-tin-hex-P-16-mer), it being \*\* which comprises the biotin combined with 16 and Maher 5'-CACAATTCCACACAAC-3' via the hexamethylenediamine linker, and has M13mp 8 DNA fragment and a complementary sequence, and, B.C.F. CHIU (Chu) and L.E. Orgel (Orgel), DNA4, and 327 - 331 pages (1985) -- therefore, it is prepared. this reference -- therefore, 10ng, 0.1ng, 0.01ng, and the nitrocellulose plot of which 0.001ng content is done are prepared in M13mp8DNA of a single stock, and the contrast blot which does not contain DNA is prepared similarly.

the MDV-1 biotin avidin addition which this blot was cut and was prepared like [ in the case of Example I ] -- a large -- the microtiter which reacts that it is superfluous -- it is moved to a well (50microper well I, and addition concentration -- about in PBS 1- it is about 10 microg/ml). this each blot is enough washed by NaCl-Tween 20 next -- new microtiter -- to a well, [ and ] It incubates with 0.1M DTT in the introduction tris buffers (pH 7.5), and 1-hour incubation and Qbeta replicase content solution 50mul (per wafer) subsequently described in previous Example II. The sample of 2microl is taken every 90 seconds for [ 1 minute - ] 30 minutes, and a blot is carried out in \*\* fault paper so that it may be described by Example II for radioactivity measurement in a scintillation counter. The radioactivity beyond a background suggests M13mpDNA on this assay blot.

Except for not incubating with DTT, by Example III and the method, example IV this example is performed by the blot and as a result, The disulfide bond which combines MDV-1 RNA with biotin avidin was not cut, but this MDV-1 RNA has left the combination to a 16-mer probe (and M13mp8 sample). However, radioactivity is measured, as it incubates with Qbeta replicase solution, a sample is taken and this blot was described by Example III.

example V this example -- instead of [ of an incubation with DTT ] -- tris buffers (pH 7.5 -- this -- it being added to a well and) These 80 \*\* of microtiters are heated for 10 minutes, and are performed by Example III and the method except for separating PUROTSUBU combined with the MDV-1 RNA reporter group from nitrocellulose blot M13mp8 sample. After cooling to a room temperature, it incubates with Qbeta replicase solution, otherwise, this sample is processed like [ in the case of Example IV ].

The 16-mer oligonucleotide probe described by example VI example III-V, In the photochemical reaction using acetic acid FUOTO biotin, a biotinylation is carried out so that it may be described by Forster (Forster) et al., Nucleic Acids Res, three volumes, and 745 - 761 pages (1985). This biotinylation oligonucleotide is separated from a starting material by the high performance liquid chromatography which uses RPC-5. this biotinylation 16-mer -- the next -- operation of Example III -- therefore, identification of M13mp8.DNA is presented.

although the 300 base fragment of example VII M13mp8 DNA is obtained from phage and a sign is chemically carried out using biotin -- this -- operation of above-mentioned Forster and others -- therefore, acetic acid FUOTO biotin is used. It is described by above-mentioned Forster and others. Operation of DOTSUTO blot mating is diverted. Next, it incubates with a biotin avidin reporter addition so that this blot may be described in Example III, and the remainder of operation of Example III is diverted in order to identify M13mp8 DNA.

By operation of nick translation by which the biotinylation was carried out through the spacer arm to the 5th place of example VIII carbon in which uridine residue is described by the above-mentioned Langer (Langer) et al. and the above-mentioned rallies (Leary). It is introduced into the oligonucleotide described in Example III. Next, according to operation of Example III of using a MDV-1 biotin avidin reporter addition as a result about 16-mer by which a biotinylation is carried out, assay to blot M13mp8DNA is performed.

In the test systems according to the "self reporting (self-report)" compatibility molecule to a nucleic acid sample, i.e., this invention, example IX this example shows use of recombination RNA

as a compatibility molecule which is also replicative form RNA for identification of the RNA itself. This example shows again the biotinylate of duplicate reporter group RNA which offers identification nature.

According to operation of U.S. Serial Number 614,350 (above) of meal (Miele) et al. (1983, above), Kramer (Kramer) and others, Recombination RNA which comprises MDV-1 RNA (thing of MDV-1 arrangement inserted between U the 64th place with G the 63rd place) with 30-mer oligonucleotide 5'-AGUCAGGCACCGUGUAUGAAUCUAACAAU-3' is prepared. this 30-mer has the arrangement of plus MITSUDO pBR322 fragment, and complementary it (see the 71-100th place in the pBR322 arrangement provided in Maniatis et al. and the above-mentioned Appendix B.)

According to the Anal.Biochem.151 volume of Matthews and others (Matthews), and 205-209 pages (1985) operation, hybridization is carried out to the blot in which this recombination RNA contains pBR322DNA2ng - 0.01pg by agency of a nitrocellulose. Recombination RNA5ng is used for each hybridization. this recombination RNA being denatured by boiling and continuing -- a hybridization solution (a 45% formamide.) It is added to 20mM sodium phosphate, 5xSSC, the 0.1% ficoll 400, 0.1% bovine serum albumin, a 0.1% polyvinyl pyrrolidone, 250mg [/ml ] denaturation salmon sperm DNA, and pH 6.4. This hybridization is performed at 42 \*\* next for 12 hours.

Following washing after this hybridization and hybridization, each circle corresponding to this sample is processed by excision and exception individual from a blot, and is vacated for tris buffers (pH 7.5). And this circle is heated by 100 \*\* for 10 minutes, and separates hybrid recombination RNA into a solution. a well -- after being cooled to a room temperature, the radioactive labeling GTP an inner solution to the non-radioactivity GTP, [ replace and ] In non-sign UTP, biotinylate GTP[biotin 11-UTP The Bethesda (Bethesda) research laboratory, .; this article purchased from Gajser SUBURUKU, the State of Maryland, and the U.S. is UTP which biotin combined with the 5th place of carbon of an uracil skeleton via 11-atom spacer arm. see Langer et al. and the above -- the same Qbeta replicase solution 50mul as what is described by; word (Ward) et al. and the Europe gazette No. 0063879 in Example II except for \*\*\*\* intermediary \*\*\*\* and a thing -- each -- it is added to a well and this plate incubates at 37 \*\*. using 96-finger ant cotter every 90 seconds for 30 minutes -- each -- the blot of the solution 2mul is carried out on a nitrocellulose filter from a well (it was marked on a filter.) each -- it has the area corresponding to a well -- each filter, following operation of Matthews and others -- a chemicals fluorescence reagent (1.25mM luminol.) 0.136M p-iodophenol or 0.68microM p-hydroxycinnamic acid is developed with a bottom SUTOREPUTA Vidin peroxidase complex of coexistence existence as 2.7mMH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1M tris buffers, pH 8.6, and an enhancement agent. Light emitted by filter is perceived next from a spot using a fluorescence microtiter plate leader. Radiation beyond a background (namely, radiation of spot origin by operation performed about samples other than pBR322DNR) shows existence of pBR322 sample in an assay solution.

Example X an addition united at least by carbon 5' of a -O-PO<sub>2</sub>-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> group and a 5'-nucleotide of 16-mer described by Example II, Except for cystamine being used instead of hexamethylenediamine, it is prepared by CHIYU (Chu) and Orgel (Orgel), DNA4, 327-331 pages, and the operation in 1985. It is prepared when an amino (2-thioethyl) addition united at least by carbon 5' of -O-PO<sub>2</sub>-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> SH and a 5'-nucleotide incubates at a room temperature with 0.1M DTT from this disulfide addition for 1 hour. Next, this thio addition is isolated from a nonreduction disulfide addition under 1mM DTT existence with high performance liquid chromatography which uses RPC-5.

An addition united at least by carbon 5' of -O-PO<sub>2</sub>-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SS(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> and a 5'-nucleotide of MDV-1 RNA is prepared so that it may be described by Example I. An ethanol precipitation disulfide addition including output of the operation origin dissolves into 0.1M DTT next, it incubates

at a room temperature for 1 hour, and a solution made as a result gives a corresponding thio addition.

0.1M DTT solution 50μl containing thio addition abbreviation 50ng of MDV-1 RNA is united with the 10 times many thio addition [ as ] mol excessive amount (that is, about 30 ng content of this thio addition is carried out in the amount of solutions originating in HDLC refining.) of 16-mer. The solution made as a result lets O<sub>2</sub> air current pass for 15 minutes, and it is permitted that the reaction produced with two thio additions advances at a room temperature overnight. Gel electrophoresis is used and MDV-1 RNA combined with 16-mer via the disulfide content skeleton is separated from other MDV-1 RNA additions and an unreacted 16-mer addition. Next, identification of M13mp8DNA is presented with the MDV-1 RNA addition combined with 16-mer via the disulfide content skeleton instead of MDV-1 RNA biotin avidin according to operation of Example III.

Example XI this example describes identification of the specific antigen on cell surface which uses the reporter system based on this invention. A part of operation described here is due to a \*\*\*\*\*- hand et al. (Horan-Hand), 43 Cancer Research, and 728-735 pages (1983) instruction. This operation is illustrated by the rat monoclonal IgG antibody to the antigen authorized prepared by standard art. A person skilled in the art will grasp getting that the antibody of other specific molds is also used for this antigen sample.

(a) Operation which uses a monolayer cultured cell: A cell which should be examined is planted with a suitable growth culture medium in \*\*\*\*\* 96 hole flat bottom product tissue culture plate, and it incubates at 37 °C for 24 hours. A growth culture medium is exchanged for a growth culture medium which contains bovine serum albumin (BSA) 10% (W/V) next. A BSA content culture medium is removed 10% after an incubation for 60 minutes, and a well is a washing medium (it is \*\*\*\*\* about 1%(W/V) BSA.). It is washed by RPMI 1640 solvent. This washing solvent is removed next, is 0.1mg/ml per well and among PBS, and is exchanged for 50μl of monoclonal antibody I to this antigen sample, and this mixture incubates at 4 °C for 2 hours. After an incubation, an uncombined antibody is removed by aspiration of an antibody solution and is continuously washed using a washing solvent. following washing -- each -- biotinylate rabbit antiserum IgG (what was purchased from Vector Laboratories, Burlingame, California, and the U.S.) which used a washing solvent for a well and was diluted to 1:1000 is added -- the solution -- a well -- it incubates at 4 °C inside for 2 hours. Next, aspirate of this anti-IgG antibody solution is carried out from a well, and a well is again washed using a washing solvent. next -- each -- PBS solution 50μl of a MDV-1 RNA biotin avidin addition of Example I is added to a well by μl in 1-10 microg /-- the solution -- a well -- it incubates at 4 °C inside for 2 hours. Next, aspirate of this solution is carried out from a well, and a well is washed by washing solvent 3 times. 0.1M DTT in tris-HCl buffer solution (pH 7.5) 50μl -- the next -- each -- it is added to a well and an incubation is performed at a room temperature for 1 hour. next -- using a 96 finger-ant cotter -- each -- supernatant liquid is removed from a well by the new microtiter plate, according to operation of Example II, the solution is made to set by Qbeta replicase solution, and assay to \*\*\*\*\* recombination MDV-1 RNA is performed.

(b) Operation which uses a cell in suspension: A cell in suspension, When :cell by which it is examined by carrying out the next ornamentation to a unique antigen by operation used to a monolayer cultured cell and in which it deals is not obtained in a form of single cell suspension (for example, lymphocyte of blood serum origin), it is processed suitably and such suspension is prepared. for example, a solution trypsinization of the cell of tissue culture origin is carried out by standard art, possible it dissociating from the culture vessel surface and made as a result -- next, it is possible to move from a culture vessel with a pipette into a suitable solvent.

A cell in single cell suspension is twice washed using RPMI 1640 solvent which is divided into a



well of a micro titer plate next, and does not contain added BSA. The cell in suspension is 4 \*\* 2-hour next, and it incubates per well with 50micro of 0.1ml/ml things g in PBS of an antibody to an antigen currently observed.

The remainder of this operation is the same as operation to a monolayer cultured cell. Washing of a cell under suspension culture is performed by cycle of aspiration of centrifugal separation which produces a pellet, aspiration of a culture medium, re-slurrying of a pellet in inside of a solvent (washing solvent) new subsequently, re-pelletizing, and a solvent.

A cell known noting that an antigen sample is not included is used as contrast to operation of this example, and it gets.

Operation mentioned above by this example includes combination of a biotinylate second antibody to an initial antibody combined with an antigen sample. Or supposing the initial antibody itself does not lose capability which a biotinylate combines with the antigen sample specifically, a biotinylate is possible for it, and a second antibody joint process is avoided. A biotinylate of an antibody is performed by a direct reaction with N-hydroxy SAKUSHINIMIDO biotin of an antibody according to Imam (Imam) et al., 45 Cancer Research, and 263 - 271 pages (1985) operation.

Example XII this example describes use of assay based on this invention which identifies protein from quality of lysis, a blood serum, or other solutions. operation described -- "a waste-cloth turn blot (Western blot)" -- it is one form of law.

When a cell involves, it is prepared by normal operation which quality of lysis solubilizes using a tris-HCl buffer solution (pH 6.8) solution (100 \*\*) which contains sodium dodecyl sulfate, 2% 2-mercaptoethanol, and 10% glycerol 2%.

Although polyacrylamide gel electrophoresis in a duplicate is presented with this quality of the dissolution (or a blood serum or other solutions) next, protein which it is identified as a marker by adjoining lane and is sold to it is moved. A standard blotting device (for example, a transformer blot device, bio-RATSUTO RABORATO lease, Richmond, California, the U.S.) is used, and this protein is moved from gel to a nitrocellulose sheet. One of the experiment gel lanes and a marker gel lane are dyed using Coomassie blue. A zone which may contain this protein sample exists in a sample, then, then, is cut from an experiment lane. A zone of a nitrocellulose paper corresponding to a gel zone which may contain a sample is cut from a paper, is dipped at 37 \*\* for 1 hour using 3(W/V)BSA in distilled water, and saturates all the nonspecific protein binding sites.

A biotinylate antibody to this protein is used as a compatibility molecule, and in order to examine whether nitrocellulose Kataue has this protein sample, operation of the following example is performed.

Example XIII this example illustrates the body of cell surface glycoprotein using assay based on this invention. Operation of this example is what changed Gordon (Gordon) and Pena (Pena), Biochem.J.208 volume, and 351-358 pages (1982) it, They used peanut agglutinin and HIMANO real agglutinin IIRAMINIDAZE processing, culture, and for normal and identifying specific-cells surface glycoprotein on Homo sapiens and skin fibrocyte of each abnormality.

A cell is planted by density of abbreviation  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> on a culture dish. The cell is washed in 24 hours and 2% (W/V) sodium dodecyl sulfate, It is solubilized using a 0.125M tris-HCl buffer solution (pH 6.8) solution (100 \*\*) of 2% (W/V) 2-mercaptoethanol, 10% (V/V) glycerol, and 0.01% bromophenol blue. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis is presented with this quality of the dissolution next, and protein is moved to a nitrocellulose sheet using a transformer blot device (bio-RATSUDORABORATO lease). This nitrocellulose sheet is cut by section of a size of about 5-cm<sup>2</sup>. A piece of a nitrocellulose made as a result is dipped in BSA solution at 37 \*\* 3% (W/V) for 1 hour, and is saturated in all the nonspecific protein-binding sites. This piece is a HBS solution (2.7 mM KCl 137 mM NaCl) next. 0.9mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5mM MgCl<sub>2</sub>, It rinses using 39mM HEPESU and

pH 7.4, and incubates at a room temperature in 10mg/ml for 1 hour among a HBS solution which contains BSA 3% with biotinylate lectin (it is suitable for a hydrocarbon skeleton on glycoprotein of this quality of the dissolution currently observed). Biotinylate lectin is a commercial item, for example, are vector RABORATO lease (BERIN game California) and \*\*\*\*\*, this piece -- next -- using a HBS solution -- 4 times \*\*\*\*\* during 30 minutes -- it is enough washed by things and incubates at a room temperature by ml in about 5 microg /for 1 hour 0.5 ml of MDV-1 RNA biotin avidin additions of Example I, and among PBS. A superfluous addition is flushed 3 times after an incubation with an avidin biotin MDV-1 RNA addition using HBS. A solution which it incubates with 0.1M DTT in tris- HCl (pH 7.5) 0.5ml next for 1 hour, and can do this piece as a result carries out the catalyst of the RNA duplicate to Qbeta replicase, and assay to MDV-1 RNA is performed by operation of Example II.

Nucleic acid of example XIV living thing specimen (for example, cell culture, organization, blood, other body fluid, food stuff, etc.) origin, Assay based on this invention, i.e., standard art which begins to pull nucleic acid in the first place, (For example, at 45 \*\*, for 20 minutes, it 30-mM-tris-HCl(s) and about 5micro of specimens l) 2mM EDTA, the 3% Triton X100 or 300 microg [/ml ] protease K. A specimen is destroyed by what is incubated with about 1 ml from pH 7.5 about 5microl, Next, assay to a sample fragment or a sample molecule is performed by performing operation which is described by a blot and example III-X on a solid support (for example, nitrocellulose) in a solution made as a result, and identifying this nucleic acid sample.

It may be known that a sample is not included although contrast in such assay is the same as a living thing specimen currently authorized.

It experiments in contrast to which a sample of a known amount was added for quantitative evaluation of the amount of samples in a specimen, when the amount of samples in a specimen compares the duplicate rates of replicative form RNA originating in a test sample with the duplicate rates originating in contrast, it is evaluated, and it gets.

Non-modified ribonucleoside triphosphate is used for operation of example XV example IX in duplicate reactions, It is diverted except for duplicate RNA being identified as follows. : The duplicate reaction solutions by which integer ratio dilution (thing of the amount of isochore) was carried out are moved to a sheet of a diethylaminoethylcellulose paper using 96-finger Al Cotter. This sheet removes ribonucleoside which was washed among 200mM NaCl and a 300mM ammonium acetate (pH 6.0) solution, and was not next crowded with room temperatures for the inside of RNA.

This sheet uses a 0.3 microg [/ml ] ethidium bromide next, and is dyed. See sharps (Sharp), 12 Biochemistr(ies), 3055-3063 pages (1973), Bailey (Bailey) and Davidson (Davidson), Anal.Biochem.70 volume, and 75-85 pages (1976).

Fluorescence from each blot is measured by some one of some the known art at the last. It of dyeing blot origin more than fluorescence intensity of contrast blot origin shows existence of a sample (namely, pBR322) in a sample blot corresponding to a dyeing blot.

It is used instead of other charges of a dyeing material being ethidium bromides, and gets. inside of these -- methylene blue (DEINGUMAN (Dingman) and a peacock (Peacock).) The 1968 above; Argentation [SAMONSU (Sammons), 1981, above-mentioned; -- above-mentioned; or FUIKOBIRI protein-Qbeta replicase conjugate fields (OOI -- (— Oi) et al., 1982, and above-mentioned; -- Stryer et al. (Stryer) and the above) will be contained in Igloi (Igloi) and 1983.

Rather than fluorescence measurement, a color of a blot originating in dyeing of RNA is evaluated rather, and it gets.

Example XVI Escherichia coli K-12 / 600 shares of cultures are transformed using pBR322, and are cultivated to  $10^8$  cells/ml under tetracycline existence. 0.1-ml culture medium The 30mM tris-HCl, 2mM EDTA, It is united with 0.1 ml of a 3% Triton X-100 or 300 microg [/ml ] protease K (pH

7.5) solution, 1 ml, 10 ml, 100 ml, and 1000 ml of each, and is heated for 20 minutes with 45 \*\* of solutions made as a result.

Escherichia coli K-12 in which a reference solution is not transformed using bottom pBRof tetracycline nonexistence322 / 600 shares are cultivated to  $10^8$  cells/ml, Next, 0.1 ml of the culture medium and 0.1 ml of protease K solutions specified by the above are set, and it is prepared by heating a solution made as a result at 45 \*\* for 20 minutes.

Next, the DOTSUTO blot of three samples each of five testing liquids each and the 3microl of a reference solution is carried out on a nitrocellulose carrier (given to 18 of 96 spaces spaces during standard 96-hole arrangement). This carrier is set at a tip of a paper towel which used 400mM NaOH and saturated it next, This nitrocellulose sheet is burned for 90 minutes at 80 \*\* by the last contacted with a paper towel which denaturalized and then saturated DNA with the (a)400mM tris-HCl, pH7.0(b)20xSSC, and (c)10xSSC continuously.

The skeleton [ mer / of example IX / 30-] according to Example I and operation of X formula- $O(PO_2)NH(CH_2)_2SS(CH_2)_2NH(PO_2)_2O-$  It has combined with MDV[ [which here, has combined a FUOSUFUO lamination date group at least with carbon 5' of a 5'-nucleotide of a 30-mer compatibility molecule and RNA which can be reproduced] ]-1(+) RNA.

It is 3 microg/ml among a compatibility molecule MDV-1 RNA hybridization solution which front hybridization of this sheet is carried out, and then is made as a result according to normal operation, Hybridization is carried out, after hybridization is washed and a compatibility molecule-MDV-1 RNA hybrid by which hybridization was not carried out is removed.

Next, this nitrocellulose sheet is set at a tip (or tip of a dry paper towel) of an EKUTEORA (ECT-EOLA) paper (Sarysu (Sarris) et al., 1982, above) sheet. \*\*\*\*\* sponge saturated with 0.1M DTT in the 0.05M tris- HCl (pH 7.5) sets to this nitrocellulose sheet tip. With capillary tube movement to a paper towel of a DTT solution, replicative form RNA is separated by reduction of disulfide of this hybrid, and serves as a duplicate moved to an EKUTEORA paper (here, positive charge adheres).

Next, it incubates with a 100microg/mlBSA solution, and this EKUTE ora paper blocks a protein binding site.

It incubates for 15 minutes with Qbeta replicase solution in which this paper is described in Example II below.

According to an incubation for 15 minutes, this paper is washed using 200mM NaCl and 5mM sodium phosphate (pH 6.5), and removes ribonucleotide which was not taken in. The radioactivity of each blot on this EKUTEORA paper is determined next, using beta-radiation scanner / digitizer (GOURIANOSU et al. (Goulianos), Anal.Biochem.103 volume, 64 - 69 pages, 1980) at least for example, in 96-.

This reproduction is performed only using non-radioactivity ribonucleoside triphosphate, the amount of RNA -- the peculiar UV absorption (KURATERAZE et al. [ for example, ] (Kulateladge).) the FUOTO printing method of 1979 and the above -- depending -- it is determined, and on Japanese lacquer or this EKUTEORA paper, directly, one of the dyeing art described in Example XV is determined, and it gets.

Existence of pBR322 in a solution authorized is shown by signal beyond a background signal (it originates in a reference solution) originating in the corresponding RNA duplicate blots on this EKUTEORA paper.

It is prepared like [ in case example XVII Escherichia coli K-12/C600 share culture medium (the thing transformed using pBR322 and the thing which is not carried out) is Example XVI ].

Next, the undiluted contrast solution, undiluted pBR322-transformation culture medium, 1:10 dilution pBR322-transformation culture medium, 1:100 dilution pBR322-transformation culture

medium, Three samples each of 1:1000 dilution pBR322-transformation culture medium and each 1:10000 dilution pBR322-transformation culture medium (all dilution uses a cell nonexistence culture medium) are added to a polypropylene micro centrifugal separation tube. each -- the 30mM tris- HCl, 2mM EDTA, and 2% Triton X-100 or 300 microg [/ml ] protease K (pH 7.5) solution 5mul are added to a well. This plate incubates at 45 \*\* for 20 minutes next. Temperature is raised to 100 \*\* and continues an incubation for 5 more minutes in the end of 20 minutes. the aqueosity salting in liquid / phenol suspension 8 of the compatibility molecule-MDV-1 RNA hybrid of Example XVI after cooling this plate to a room temperature -- mul5 microg/ml -- each -- it is added to a well and hybridization will be performed for 5 minutes in corns (Kohne) and (1977) according to the above.

each -- a well -- the water-phenol mixture of the origin is given to agarose gel electrophoresis next, and separates pBR322 (the thing which carried out hybridization to compatibility molecule-MDV-1 RNA, and the thing which is not carried out) from far small Shinwa nature child-MDV-1 RNA. This gel is dipped into 0.1M, DTT, and the 0.05M tris- HCl (pH 7.5), and separates replicative form RNA by cleavage of the disulfide between a compatibility molecule and this RNA.

This replicative form RNA is moved to EKUTEORA and a \*\*-par next by electric blotting (a SUTERU work (Stellwg) and Dalberg (Dahlberg), Nucl.Acids Res.8 volume, 299 - 317 pages (1980)). Finally, duplicate RNA reproduces in an EKUTEORA paper. - Operation of Example XVI is diverted after a process that a blot is carried out, and a duplicate of RNA which can be reproduced, and a check of whether pBR322 exists in a sample as which this duplicate RNA is identified and authorized are performed.

This invention contains a bioassay system which progressed more nearly intentionally than a system of advanced technology for sensitivity by which it is attained by use of a reporter system based on a RNA duplicate by RNA-dependency RNA polymerase, and in which it deals. Sensitivity of assay which uses these reporter systems should be measured by only background originating in nonspecific adsorption of a compatibility molecule and RNA which can be reproduced. Otherwise, sensitivity of such assay should be limited to theoretical restriction of one molecule per sample. This invention also does a certain amount of details for \*\*\*\*\*, without obvious ornamentation deviating from the direction of this invention, although intermediary description has been carried out.

The various features of this invention are shown in the following claim.

---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2710159号

(45) 発行日 平成10年(1998) 2月10日

(24) 登録日 平成9年(1997) 10月24日

(51) Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	Z
C 0 7 H 21/02			C 0 7 H 21/02	
G 0 1 N 33/532			G 0 1 N 33/532	Z
// C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A

発明の数 4 (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願昭62-502628  
(86) (22) 出願日 昭和62年(1987) 4月15日  
(65) 公表番号 特表平1-500005  
(43) 公表日 平成1年(1989) 1月12日  
(86) 国際出願番号 P C T / U S 8 7 / 0 0 8 8 0  
(87) 国際公開番号 W O 8 7 / 0 6 2 7 0  
(87) 国際公開日 昭和62年(1987) 10月22日  
(31) 優先権主張番号 8 5 2 , 6 9 2  
(32) 優先日 1986年4月16日  
(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(73) 特許権者 999999999  
ザ・ソーク・インステテュート・フォー  
バイオロジカル・スタディーズ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州92037,  
ラ・ホーラ, ノース・トーレイ・バイン  
ズ・ロード 10010  
(74) 代理人 弁理士 浅村 昭 (外3名)  
審査官 平田 和男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複製型RNAリポーター・システム

1

(57) 【特許請求の範囲】

1. 試料中の生体高分子検体の存在を測定する方法であって、

(i) 該試料を該検体にとっての親和性分子に、該親和性分子と該検体との間に結合が生じるような条件下にさらし;

(ii) 該親和性分子が複製型RNAではない場合、段階(i)の前か後のいずれかで、複製型RNAを段階(i)で使用された親和性分子に結合させ;

(iii) RNA依存RNAポリメラーゼを使用して、検体に結合される親和性分子に結合されるかまたは結合されていた、あるいは検体に結合されていた親和性分子である、複製型RNAの複製に触媒作用を及ぼし;そして

(iv) 段階(iii)の反応によってつくられたRNAを検出することからなる方法。

2

2. 検体が核酸であり、親和性分子が該検体の断片の配列に対して相補性である約20ないし約4000塩基の配列を有する断片を含む複製型RNAであり、該複製型RNAの複製は検体からの該RNAの解離後である請求の範囲第1項の方法。

3. 複製型RNAの親和性分子への結合は、RNA依存RNAポリメラーゼによる複製可能性を失うことなく複製型RNAに結合された第1連結部分および親和性分子と検体との間の結合の特異性を失うことなく親和性分子に結合された第2連結部分によって行なわれ、該第1および第2連結部分は互いに共有的に結合されているか特異的結合対であるかのいずれかである請求の範囲第1項の方法。

4. 親和性分子への複製型RNAの結合が、複製型RNAと、親和性分子に結合されるかそれに含まれている少なくとも長さ10塩基の核酸の断片とのハイブリダイゼーションに

よって行なわれる請求の範囲第1項の方法。

5. RNA依存RNAポリメラーゼがQ $\beta$ レプリカーゼであり、組換え複製型RNAが該レプリカーゼによるインビトロでの複製のための鋳型である請求の範囲第2項の方法。

6. 複製型RNAの複製が放射能標識リボヌクレオシド-5'-トリホスフェートによって行なわれ、得られた複製されたRNAが放射能標識されている請求の範囲第5項の方法。

7. RNA-依存RNAポリメラーゼがQ $\beta$ レプリカーゼであり、複製型RNAがインビトロでの該レプリカーゼによる複製のための鋳型である請求の範囲第3項の方法。

8. 複製型RNAの複製は放射能標識リボヌクレオシド-5'-トリホスフェートによって行なわれ、得られた複製されたRNAが放射能標識されている請求の範囲第7項の方法。

9. 親和性分子を試料にさす前に、第1連結部分および第2連結部分がジスルフィド部分によって互いに共有的に結合されている請求の範囲第8項の方法。

10. 第1連結部分が式-O-PO<sub>3</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-(式中ホスホラミデート部分が複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、nが2~8である)で表わされ、第2連結部分が式-O-PO<sub>3</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-S-(式中ホスホラミデート部分が核酸親和性分子の5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、mはnと同じでも異なってもよく、2~8である)で表わされる請求の範囲第9項の方法。

11. 親和性分子が少なくとも1つのプリン残基の断片を有する核酸であり、該断片は親和性分子の3'-末端にあって、親和性分子の検体結合断片の外側にあり、該親和性分子の3'-末端はホスホジエステルによって複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合される請求の範囲第8項の方法。

12. 親和性分子及び複製型RNAがスマートプローブにおいて組合せられる請求の範囲第9項の方法。

13. 第1連結部分と第2連結部分とが特異的結合対である請求の範囲第8項の方法。

14. 第1及び第2連結部分の一方がビオチニルであり、他方が、ビオチニルと複合体を形成することによって親和性分子または複製型RNAに結合されたアビジンである請求の範囲第13項の方法。

15. ビオチニル部分が式-O-PO<sub>3</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>-(S)<sub>q</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>-NH-(式中上記ホスホラミデート部分は5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、pおよびrは同じか異なっており、各々2~8であり、qは0または1である。)のスペーサーアームによって複製型RNAの5'-ヌクレオチドに結合されている請求の範囲第14項の方法。

16. 親和性分子がビオチニル化された抗体であり、アビジンが複製型RNAに結合された該ビオチニルと複合体

を形成する請求の範囲第15項の方法。

17. 親和性分子がビオチニル化したレクチンであって、アビジンが複製型RNAに結合された該ビオチニルと複合体を形成する請求の範囲第15項の方法。

18. 親和性分子が、光化学的にフォトビチオンで、あるいは酵素的に、ウラシル部分のC-5によってビオチニルと結合されているdUTPまたはUTPあるいはアデニン部分のC-8またはC-8によってビオチニルに結合されているdATPで、あるいは化学的に5'-ヌクレオチドの5'-炭素において式-O-PO<sub>3</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>-(SS)<sub>t</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>-NH-(式中ホスホラミデート部分は5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、sおよびuは同じか異なっており、各々2~8であり、tは0~1である)のスペーサーアームでビオチニル化された核酸であり、アビジンが複製型RNAに結合されたビオチニルと複合体形成している請求の範囲第15項の方法。

19. 親和性分子が5'-ヌクレオチドの5'-炭素でビオチニル化されている請求の範囲第18項の方法。

20. 複製型DNAに結合された親和性分子を検体に結合後で複製型RNAの複製前に、第1及び第2連結部分を共有的に結合しているジスルフィドを還元することによって親和性分子から複製型RNAが分離される請求の範囲第9項の方法。

21. 複製型RNAに結合した親和性分子を検体に結合後で複製型RNAの複製前に、第1および第2連結部分を共有的に結合しているジスルフィドの還元によって親和性分子から複製型RNAが分離される請求の範囲第10項の方法。

22. 複製型DNAに結合された親和性分子を検体に結合後で複製型RNAの複製前に、酸による脱プリン化とそれにつづく $\beta$ -脱離によってホスホジエステル結合を切断することにより親和性分子から複製型RNAを分離する請求の範囲第11項の方法。

23. 複製型DNAに結合した親和性分子を検体に結合後で複製型RNAの複製前に、第1と第2連結部分を共有的に結合しているジスルフィドの還元によって親和性分子から複製型RNAを分離する請求の範囲第12項の方法。

24. スペーサー基のqが1であり、複製型RNAに結合された親和性分子を検体に結合後で複製型RNAの複製前に、複製型RNAをビオチニルに結合しているスペーサーアームのジスルフィドの還元によって親和性分子から複製型RNAが分離される請求の範囲第15項の方法。

25. スペーサー基のqが1であり、複製型RNAに結合された親和性分子の検体への結合後で複製型RNAの複製前に、複製型RNAをビオチニルに結合するスペーサーアームのジスルフィドの還元によって親和性分子から複製型RNAを分離する請求の範囲第16項の方法。

26. スペーサー基のqが1であって、複製型RNAに結合された親和性分子の検体への結合後で複製型RNAの複製前に、複製型RNAをビオチニルに結合するスペーサー

アームのジスルフィドの還元によって親和性分子から複製型RNAを分離する請求の範囲第17項の方法。

27. スペーサー基のqが1であり；複製型RNAに結合された親和性分子の検体への結合後で複製型RNAの複製前に、複製型RNAをビオチニルに結合するスペーサーアームのジスルフィドの還元によって親和性分子から複製型RNAを分離する請求の範囲第19項の方法。

28. RNA-依存RNAポリメラーゼがQβレプリカーゼであって、組換え複製型RNAがインビトロでの該レプリカーゼによる複製のための鋳型である請求の範囲第4項の方法。

29. 親和性分子が核酸である請求の範囲第28項の方法。

30. RNA依存性RNAポリメラーゼにより複製されうる複製型RNAに結合された目的の分子と特異的に結合しうる親和性分子。

31. 複製型RNAの親和性分子への結合は、RNA依存RNAポリメラーゼによる複製可能性を失うことなく複製型RNAに結合された第1連結部分および親和性分子と検体との間の結合の特異性を失うことなく親和性分子に結合された第2連結部分によって行なわれ、該第1および第2連結部分は互いに共有結合されているか特異的結合対であるかのいずれかである請求の範囲第30項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

32. 複製型RNAがQβレプリカーゼによるインビトロでの複製のための鋳型である請求の範囲第31項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

33. 第2連結部分と第1連結部分が親和性分子および複製型RNAに各々共有的に結合し、ジスルフィド部分によって互いに共有的に結合されている請求の範囲第32項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

34. 第1連結部分が式 $-O-PQ_n-NH-(CH_2)_n-S-$ （式中ホスホラミデート部分が複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、nが2～8である）で表わされ、第2連結部分が式 $-O-PQ_m-NH-(CH_2)_m-S-$ （式中ホスホラミデート部分が核酸親和性分子の5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、mはnと同じでも異なってもよく、2～8である）で表わされる請求の範囲第33項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

35. 親和性分子が少なくとも1つのプリン残基の断片を有する核酸であり、該断片は親和性分子の3'-末端にあって、検体の標的断片の配列に対して相補性である配列を有する親和性分子の断片の外側にあり、該親和性分子の3'-末端はホスホジエステルによって複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合されている請求の範囲第32項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

36. 第1連結部分を第2連結部分が特異的結合対である請求の範囲第32項の親和性分子-複製型RNAハイブリ

ッド。

37. 第1及び第2連結部分の一方がビオチニルであり、他方が、ビオチニルと複合体を形成することによって親和性分子または複製型RNAに結合されたアビジンである請求の範囲第36項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

38. ビオチニル部分が式 $-O-PQ_q-NH-(CH_2)_q-(S)_s-(CH_2)_t-NH-$ （式中上記ホスホラミデート部分は5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、pおよびrは同じか異なっており、各々2～8であり、qは0または1である。）のスペーサーアームによって複製型RNAの5'-ヌクレオチドに結合されている請求の範囲第37項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

39. 親和性分子はビオチニル化抗体である請求の範囲第38項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

40. 親和性分子がビオチニル化レクチンである請求の範囲第38項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

41. 親和性分子が、光化学的にフォトビオチンで、あるいは酵素的に、ウラシル部分のC-5によってビオチニルと結合されているdUTPまたはUTPあるいはアデニン部分のC-6またはC-8によってビオチニルに結合されているdATPで、あるいは化学的に5'-ヌクレオチドの5'-炭素において式 $-O-PQ_s-NH-(CH_2)_s-(SS)_r-(CH_2)_t-NH-$ （式中ホスホラミデート部分は5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、sおよびuは同じか異なっており、各々2～8であり、tは0～1である）のスペーサーアームでビオチニル化された核酸であり、アビジンが複製型RNAに結合されたビオチニルと複合体形成している請求の範囲第38項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

42. 親和性分子が5'-ヌクレオチドの5'-炭素でビオチニル化されている請求の範囲第41項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

43. 複製型RNAの親和性分子が、RNA依存RNAポリメラーゼによる複製可能性を失うことなく複製型RNAに結合された連結部分を介して結合しており、かつ前記連結部分は複製型RNAと親和性分子との間の結合を共有結合によってなしうるものである請求の範囲第30項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

44. RNA依存性RNAポリメラーゼによる複製型RNAのインビトロでの複製可能性を失うことなしに、連結部分に結合された複製型RNAであって；該連結部分は、複製型RNAと親和性分子との間の結合を親和性分子と結合している連結部分への共有結合によって結合を行うことができるRNA依存性RNAポリメラーゼにより複製されうるRNA。

45. インビトロでのQβレプリカーゼによる複製のための鋳型である請求の範囲第44項の複製型RNA。

46. 複製型RNAが結合されている連結部分が硫黄、ビオチニル、または複合体形成によってビオチニルに結合



されたアビジン（一方このビオチニルは複製型RNAに結合されている）である請求の範囲第45項の複製型RNA。

47. 連結部分がビオチニルまたはアビジンであり、どちらの場合でも、ビオチニルが式 $-O-PO_3-NH-(CH_2)_p-(SS)_q-(CH_2)_r-NH-$ （式中上記ホスホラミデート部分は5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、pおよびrは同じか異なり、各々2~8であり、qは0または1である。）のスペーサーアームによって複製型RNAの5'-ヌクレオチドに結合されている請求の範囲第46項の複製型RNA。

48. 連結部分が硫黄であって式 $-O(PO_3)NH(CH_2)_p-$ （式中ホスホラミデート基は5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合され、pは2~8である）のスペーサー基によって複製型RNAの5'-ヌクレオチドに結合される請求の範囲第46項の複製型RNA。

49. 核酸親和性分子に共有的に結合されたRNA依存性RNAポリメラーゼにより複製される複製型RNAからなるスマートプローブ。

50. 複製型RNAがQ $\beta$ レプリカーゼによる複製のための鋳型であり、複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素および親和性分子の5'-ヌクレオチドの5'-炭素は式 $-O(PO_3)NH(CH_2)_p(SS)_q(CH_2)_rNH(PO_3)_yO-$ （式中yとzは同じか異なり各々2~8である）の部分によって結合されている請求の範囲第49項のスマートプローブ。

51. 親和性分子が5'-クランプ断片および3'-クランプ断片の両方を有する請求の範囲第50項のスマートプローブ。

52. 複製型RNAが親和性分子の3'-末端における断片の配列と相補性の配列をもつ断片を有する複製型組換えRNAである請求の範囲第50項のスマートプローブ。

53. 親和性分子が、該親和性分子に結合された、あるいはそれに含まれた少くとも10塩基の長さの核酸の断片と複製型RNAとのハイブリダイゼーションによって複製型RNAに結合されている請求の範囲第30項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

54. 複製型RNAがインビトロでのQ $\beta$ レプリカーゼによる複製のための鋳型である請求の範囲第53項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

55. 親和性分子が蛋白質である請求の範囲第54項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

56. 親和性分子が核酸である請求の範囲第54項の親和性分子-複製型RNAハイブリッド。

#### 【発明の詳細な説明】

本発明は、ポリ核酸及びポリペプチドを含む生体高分子のアツセイに向けられたものであり、より詳細には、RNA依存性RNAポリメラーゼにより触媒される自己複製の鋳型となるRNAに基づくリポーター・システムを用いるアツセイに関する。

本発明の背景

非常に大量の非関連物質を背景に含むサンプル中にある特定の少量の生体高分子を検索することが時々必要となる。いくつかの重要なケースとしては、感染した患者の血液や他の体液中に微量存在するウイルスや抗病原菌抗体についてのイムノ・アツセイとか、細胞表面に散在するレセプターについてのアツセイ、さらに、食品中に微量存在する病原菌、体液中に微量存在する病原性原生動物、バクテリア、ウイルス、或いは、ある種の全遺伝子DNA中の遺伝子の異常を示す決められた配列の短い断片についての核酸プローブ・ハイブリダイゼーション・アツセイなどがある。

そのようなアツセイの特異性は、サンプル中に試験されている本体（例えばウイルスとか、他の微生物、特別なレセプターをもつ細胞、異常遺伝子）が存在している限りにおいて、サンプル中に存在する生体高分子検体（即ち、特定の標的生体高分子、又は、特定の標的部位、又は生体高分子の一部）に特異的に結合する親和性分子を用いることに依存している。親和性分子の例としては抗体を誘導するのに用いられる抗原となつているタンパク質の標的に対する抗体、又は、標的DNA又はRNAの標的部分と相補的な配列をもつオリゴ・ヌクレオチド、又は、抗原により誘導される抗体となつている抗体の標的に対する抗原、さらに、標的糖タンパク又は標的ポリ多糖のある特定の炭化水素部分に特異的に結合するレクチンなどがある。

アツセイしているサンプル中に存在する生体高分子検体のいずれかと結合した親和性分子の検出は、典型的には、リポーター・システムの一部分として検出するシグナルを発生するリポーター・グループを親和性分子と複合させるか、とりこませることによつてなされる。アツセイの感染は、アツセイ系における親和性分子と生体高分子検体の結合の特異性、と、アツセイ系における親和性分子だけからシグナルを生じさせるリポーター・システムの特異性、さらに、アツセイ系におけるリポーター・システムから生じたシグナルの強度に依存することになる。

典型的なリポーター・システムでは、リポーター・グループとして蛍光有機分子や<sup>32</sup>Pでラベルしたリン酸基を用いている。リポーター・グループから直接生じるシグナルが係わってくる、このようなタイプのリポーター・システムによつて達成される感度は、根本的には検出するだけの強度のシグナルを生じさせるのに必要とするリポーター・グループの数によつて制限を受ける。従つて、これらのグループでは、約10<sup>4</sup>個以下の標的分子又は標的部分をアツセイして検出することはできない。生体高分子検体に対する非放射活性アツセイの感度は、親和性分子を連結した酵素を用いることにより改善されてきた。例えば、ビオチニル化（biotinylated）したオリゴヌクレオチド又はDNA親和性分子“プローブ（probe）”は、酵素に連結したアビジン（avidin）リポー



ター・グループをビオチン・グループと複合体を形成させ、次に、酵素によつて触媒される反応生成物を検出することにより検出される。Langerら、Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.) 78巻、6633-6637ページ (1981); Learyら、Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.) 80巻、4045-4049ページ (1983)。また、酵素に連結させたアビジンをイムノ・アッセイにおけるリポーター・グループとしたものに関しては、HeveyとMalmros、米国特許No.4,228,237を参照せよ。酵素を親和性分子と結合させ、さらにその酵素により触媒される反応の基質を供することにより、それぞれの酵素-親和性分子-検体の複合体について大量の数の生成分子を蓄積させ、それ故、原則的には、少数のリポーター分子を直接用いることによりよりもずっと大きな感度を得ることが可能となる。感度の高い色素法によつて容易にアッセイできるペルオキシダーゼ (peroxidase) やホスファターゼ (phosphatase) などの酵素は、酵素に結合したリポーター・グループとして広く利用されている。Learyら先に引用。

しかしながら、アビジンを連結したホスファターゼが係わってくるような酵素付加リポーター・システムは、根本的には、リポーター・グループの酵素によつて触媒される反応がおこりうる速度によつて、感度において制限を受けることになる。実際の問題として、酵素触媒反応の生成物の検出しうる量とは、大体1時間から100時間といった適正な時間内のアッセイで生産されるものでなければならない。実際には、酵素-付加リポーター・システムは、<sup>32</sup>P崩壊に基く、リポーター・システムより約10倍から100倍感度が劣る。

より感度に富み、標的生体高分子の単一分子、又は標的生体高分子断片の単一断片の存在までが、原則として、数時間たらずのアッセイで検出しうる程度のリポーター・システムが必要とされている。そのようなリポーター・システムでは、反応を通じて、検体分子又は断片あたり比較的短い時間内に莫大な数の生成分子を生産するような被検体の存在が必要となってくる。

酵素によつて触媒される核酸の重合反応は鋳型から、相補配列をもつ鎖を生成し、この鎖はまた関連するポリメラーゼの基質になる。こうしてくり返し反応がおこることにより、特定のヌクレオチド鎖の数が対数的に増大するのである。従つて核酸の自己複製をリポーター・システムの感度の向上に用いるのは、有利である。

核酸の重合反応を、検出しうる微量の検体の検出に利用した例が、R.K.Saikiら、Science, 230巻、1350-1354ページ (1985年) 及びヨーロッパ特許出願広報No.0164054に記載されている。Saikiら、上述、はE.coli DNAポリメラーゼIとともに、dATP, dCTP, dGTP, dTTP, と、さらに2つの合成オリゴヌクレオチドプライマー即ち、1つは、センス鎖の3'末端の近くの部分に相補的な配列をもつもの、そしてもう一方は検体DNA断片のアンチ・センス鎖の3'末端の近くの部分に相補的な配列をもつもの

のを用いており、サンプル中の検体の量を標準的なDNAプローブ・アッセイ技術で容易に検出できるレベルまで増大させるのである。Saikiらの方法には、多数のサイクルからなるDNAポリメラーゼ-触媒複製、鎖の分離、さらにプライマー・アニーリングが含まれる。検体の量は、サイクル数に伴つて対数的に増加し、少なくとも複製の開始断片の濃度が、ポリメラーゼ分子の濃度を上回るまでになる。Saikiらにより記述される方法では、少なくとも3つの合成オリゴヌクレオチドが必要であり、2つはプライマーで、また少なくとも1つは検体を検出するプローブである。Saikiらの方法における複製の各サイクルは、3ステップからなる。従つて、Saikiらの方法ではDNAの自己複製を利用して検体の量を増大させることにより、DNAプローブ・アッセイの感度を増大させるのであるが、その一方で核酸の自己複製を通じて、生体高分子又はその特定の断片又はその部位に対するアッセイの感度を増大させるような、より簡便で、より一般的に応用可能な方法が依然として必要とされているのである。

20 酵素により触媒される、RNA配向性の、RNA重合は、相補鎖を迅速に生産し、しかもプライマーを必要としないのである。RNA鎖の数は、RNA配向性の、RNA重合の反応サイクルのくり返しにつれて対数的に増加していく。イン・ビトロの他の重合反応と異なり、RNA配向性のRNA重合は、サイクル間に鎖の分離とプライマー・アニーリングを必要とすることなく、連続的に進行する。酵素によつて触媒される、RNA配向性のRNA重合は“自動触媒複製”と呼ばれてきた。

HarunaとSpiegelman, Science, 150巻、884-886ページ (1965年)。本発明があるまでは自動触媒複製を生体高分子検体の簡便で、広く応用可能で高感度のリポーター・システムに利用することができるとは考えられていなかった。

30 Mieleら、J.Mol.Biol., 171巻、281-295ページ (1983年) では、デカアデニル酸部分を、突然変異中間変種-1 RNAの、バクテリオファージQβのRNA依存性RNAポリメラーゼ (“レプリカーゼ”) の機能には必須ではない位置への挿入を記述しており、さらに、組み換え中間変種-1 RNAが、レプリカーゼによる複製の鋳型として活性でありつづけることを報告している。Kramerら、米国特許出願No.614,350 (1984年5月25日整理) も参照せよ、これはここで参考文献に含まれている。Kramerらの出願は、中間変種及び同類のRNAに基く、Qβレプリカーゼ活性による複製のための組み換えRNA鋳型と、さらに、そのような鋳型の、核酸ハイブリダイゼーション・プローブとしての利用について記述している。Mieleらの報文も、Kramerらの特許出願も、ともに、生体高分子検体のアッセイのリポーター・システムの基礎としての複製型RNA及びこれに関連したRNA依存性RNAポリメラーゼの利用について示唆していない。さらに、報文と特許出

順のどちらも、標的核酸断片のプロープとして用いられる組み換え複製型RNAが、標的とのハイブリダイゼーションにつづいて複製され、プロープを用いたアッセイの感度を増大させることについては示唆していない。

#### 本発明の要約

本発明は、ある種のRNAのイン・ビトロでの自動触媒複製が、生体高分子検体のアッセイの高感度のリポーター・システムとして利用可能である、という我々の発見に基いている。

従つて、本発明は、特定の生体高分子検体を検出するアッセイで、感度を高度に増強させたリポーター・システムに関する。このリポーター・システムは、バクテリオ・ファージQ $\beta$ のRNAポリメラーゼによるイン・ビトロでの複製が可能で、中間変種-1 RNA及びその突然変異体を含む、RNA配向性のRNAポリメラーゼによるイン・ビトロでの複製が可能で、迅速な、対数的な、酵素触媒による複製に基いている。

本発明のリポーター・システムは、そのような複製型RNAを親和性分子に加え、これがアッセイ中の生体高分子検体と特異的に結合することに係わっている。もし検体がポリヌクレオチドの断片である場合には、複製型RNAは、それによつて検体断片とハイブリダイゼーションがおこるような検体断片と相補的な配列をもつ、DNAまたはRNAで、断片を含むポリヌクレオチドあるいは、オリゴヌクレオチド親和性分子と、連結させることができる。もし検体が、例えば、ウイルスの外被タンパクとか、培養中の細胞の溶解に際して放出される興味あるタンパクなどのタンパク質である場合には、RNAはアッセイ・システム中の検体タンパクと特異的に結合する抗体親和性分子と連結させることができる。もし検体が、炭水素残基を含む糖タンパクとか、ポリ多糖のような分子である場合、複製型RNAは、炭水素残基と特異的に結合するレクチン親和性分子と連結させることができる。

複製型RNAは、親和性分子がアッセイ・システム中に存在するいずれかの生体高分子検体と複合体をつくる前に、又はつくつた後でも、親和性分子と結合させることができる。

なぜならば、複製型RNAが親和性分子と結合した後で、検体に結合した親和性分子を検出するためには、このRNAの複製が必要となるからである。ここでa) RNAは、結合している間でも、RNA依存性RNAポリメラーゼにより複製されることができるような様式で親和性分子と結合しているか、あるいは、b) RNAは、分離したRNAがRNA依存性ポリメラーゼによつて複製されることができるような形で、親和性分子から分離できるような様式をとつて親和性分子と結合しているのである。

親和性分子に結合した複製型RNAから複製されたRNA、即ち、今度はアッセイ・システム中の検体に結合しているRNAの検出は、数多くの既知の技術のいずれかを用い

て行うことができる。例えば、RNAの複製は、放射活性で標識したリボヌクレオシド-5'-三リン酸を用いて行なうことができ、次に複製の結果生じた放射活性をもつRNAを検出するのである。別の方法として、ビオチニル化したリボヌクレオシド-5'-三リン酸を複製過程の基質として用いることができ、さらに、その結果生じたビオチニル化したRNAは、例えばLearyら（先に引用）により開示されるように、酵素-アビジン付加物を利用して検出することができる。また、複製されたRNAは紫外線吸収や又は染色により、直接に検出することができる。

#### 本発明の詳細な記述

一面からみて本発明はサンプル中の検体の存在を決定する方法であり、これは、

- i) 親和性分子と検体の間で結合がおこるような条件下で、サンプルを上述の検体親和性分子にさらし、
- ii) もし上述の親和性分子、それ自体が、複製型RNAではない場合、ステップi)の前又は後で、複製型RNAを、ステップi)で用いた親和性分子に結合させ、
- iii) RNA依存性RNAポリメラーゼを用いて、検体に結合した親和性分子に結合している、又は、した複製型RNAあるいは、検体に結合している親和性分子である複製型RNAの複製を触媒させる、そして
- iv) ステップiii)の反応で生成したRNAを検出する、以上ステップから構成される。

他の側面からみると、本発明は親和性分子-複製型RNA複合分子、即ち、複製型RNAに結合した親和性分子を伴っている。親和性分子は複製型RNAに、RNA依存性RNAポリメラーゼによる複製型RNAの複製をおこさせなくすることがないように、複製型RNAに共有結合した第1の連結部分を介して、さらに、新和性分子とその検体との特異的な結合を妨げないように複製型RNAに結合した第2の連結部分を介して、結合させることができるのである。また、ここで述べた第1と第2の連結部分は、お互いに共有結合しており、特異的な結合対を形成しているかあるいは、通常の第3の連結部分とも特異的な結合対を同時に形成しているのである。

本発明はまた、“スマートプローブ (smart probe)” を必然的に伴っており、即ち、これは、核酸である親和性分子が複製型RNAに結合していて、さらに、親和性分子が、その検体と結合していない場合には、複製型RNAがRNA依存性RNAポリメラーゼによる複製の誘型として不活性であるように、複製型RNA部分と結合している化合物である。

本発明はさらに、塩基対を介して、複製型RNAに非共有的に結合している親和性分子を必然的に伴っている。

さらにまた一面からみると、本発明はRNA依存性のRNAポリメラーゼによる複製型RNAの複製を妨げることなく、連結部分に結合した複製型RNAに係わっており、ここでいう連結部分とはこれにより、他の連結部分対に結

合した複製型RNAと親和性分子との間の連結が特異的な結合対として、連結部分の共有的な結合により、あるいは、連結部分の相互作用により生じる、1対の連結部分のことである。

本発明に従う、一対の連結部分の1つに結合した、そのような複製型RNAは、検体との結合の特異性を失わないように他の連結部分対に結合したいかなる親和性分子に対しても、普遍的なリポーター・グループである。

“検体”とは、サンプル中でのその存在や濃度をアッセイで決定される物質のことを意味する。検体は時には、アッセイの標的物質、あるいは標的断片のことをさしている。本発明に従うアッセイでは、検体とは通常、生体高分子あるいは生体高分子の断片のことである。検体には、例えば糖タンパク、リボタンパク、酵素、ホルモン、レセプター、さらに抗原、抗体などのタンパク質や、核酸(DNA, RNA)、核酸の断片、そしてポリ多糖などを含んでいる。

本発明のアッセイでは検体は、もしそれが存在していれば、あるいは存在していさえすれば、サンプル中に存在する生物本体に関連していることもしばしばである。そのような生物本体には、ウィロイド(検体は核酸又はその断片である)；ウイルス(検体は例えばウイルス外被タンパク、ウイルス・ゲノム、ウイルス・ゲノムの断片、あるいはウイルスに対する抗体などである)；他の微生物(検体は例えば、微生物のゲノムの断片又は、RNA、微生物により生産される毒素、微生物に遺伝子工学を施したときに生産される異種タンパクなどである)

(原動物寄生虫に関しては、Lizadi Noguiera, ヨーロッパ特許出願公報No. 0135108を参照のこと)；がん細胞のような異常細胞(検体は例えば異常細胞の細胞表面抗原である)；あるいは、異常遺伝子(検体は例えば、遺伝子異常をおこす変調塩基を含む遺伝子断片とか、異常遺伝子から転写された結果生じる変調塩基を含むメッセンジャーRNA断片とか、又は、異常遺伝子が発現して生じた異常タンパクである)、以上が含まれる。検体はまた、例えば、ホルモンのような特定のタンパクでもありえ、その血清中や体液中の存在や濃度をアッセイで決定することになる。必然的に2つの抗体を使うことになるイムノ・アッセイの場合、検体は、(サンドイッチアッセイの場合には)第一の抗体に結合した抗原であり、又は、(イムノソルベントアッセイの場合には)抗原に結合した第1の抗体になるであろう。多くの他のタイプの検体が技術に精通した者にとつては明らかであろう。

検体の記述から、本発明はイムノ・アッセイや核酸プローブ・ハイブリダイゼーション・アッセイに用いる応用も含んだ広い応用の可能性がある。こうして、他の応用の中でも、本発明は植物や、人間を含む動物の病気の診断に有用であり、さらに食物や血液、組織培養のような試料の汚染の検査に有用である。

検体に対する“親和性分子”とは検体に親和性をもつ

物質(あるいは、異つた名前をつけると、特異的に結合する物質)の分子のことである。特定の検体に特異的に結合する物質や、それらの調製方法は、本技術分野においてよく知られているところである。

抗原検体(それ自体抗体であるかもしれない)に対しては、モノクローナル抗体を含む抗体が、特異的結合物質として利用可能である。唯一つの抗体を含むサンプル中のある種の抗体検体に対しては、ブドウ球菌プロテインAのような抗体結合タンパクを特異的結合物質として用いることができる。

核酸(DNA又はRNA)あるいはその断片の検体については、検体の断片と相補的な配列の部分を含む、オリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド(双方とも、DNA又はRNA)を特異的結合物質として用いることができる。そうした親和性分子は自動合成技術を含むイン・ビボ(in vivo)又はイン・ビトロ(in vitro)の多くの既知の方法のいずれかにより合成することができる。技術分野において理解されているように、DNA又はRNA親和性分子が、アッセイにおける前もつて決定された特異性を発揮するために持たなければならない長さは、部分的には、アッセイしているサンプル中の核酸の量や複雑さに依存している。そのような親和性分子は通常、少なくとも10ヌクレオチドを必要とする。1つの糖タンパク又は一連の糖タンパク、あるいは、1つのポリ多糖又は一連のポリ多糖のような、レクチンに、特異的に結合する炭化水素部分をもつことによりサンプル中の他の物質と区別される検体については、適当な特異的結合物質はレクチンである。

ホルモンの検体については、ホルモンのレセプターを特異的結合物質として用いることができる。逆に、ホルモンのレセプターが検体のときは、ホルモンを特異的結合物質として用いることができる。

酵素の検体については、酵素の阻害物質を特異的結合物質として用いることができる。検体が酵素の阻害物質のときは、酵素を特異的結合物質として用いることができる。

通常、検体分子と検体分子に対する親和性分子は、特異的結合対として、即ち、これらの相互作用は非共有結合(例えば塩橋、水素結合、疎水的相互作用)のみを介しているものとして関係している。

熟練者は、サンプル中の親和性分子と、存在するかもしれない検体との間の結合がおこる条件を容易に決定することができる。詳細には、熟練者は技術分野において“特異的結合”と考えられている、親和性分子と検体との間の結合を生じさせることができる条件を容易に決定することができる。技術分野において理解されているように、そのような特異性は通常親和性分子がサンプル中の他の物質と構成物(例えば器壁や固体担体)よりも、検体に対してより高い特異性を示すことによる。

本発明のアッセイ方法を実行するサンプルは、血清

や、他の体液、又は組織培養培地や食料品のような生物物質の生のままの標本であることもありえる。より典型的には、本方法は、生の標本を親和性分子の非特異的結合を生じさせるなどして、検体の検出を妨げるような物質を取り除く各種の処理を施すことにより得られた、加工した標本のサンプルについて実施される。生の標本を加工して、本発明のアツセイ方法により適したサンプルを得るための方法は、技術分野においてよく知られている。

こうして、本方法は、GrunsteinとHogues, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 72巻、3961-3965ページ (1975年) (例えばFalkowとMoseley, 米国特許No. 4,358,535; 及びShafritz, 米国特許No. 4,562,159なども参照せよ) のコロニーハイブリダイゼーション法や、あるいは、BentonとDavis, Science, 196巻、180-182ページ (1977年) のブレイク・リフト法に従って細胞から得た核酸について実行することができる。本方法は、また、ウイロイドやウイルス、あるいは標本の細胞から単離され、固体担体上 (計量棒 (dipstick) 上の固体担体や、マイクロ稀釈プレート・ウェルの内壁なども含んでいる) に付着させた (GillespieとSpiegelman, J. Mol. Biol. 12巻、829-842ページ (1965年)) 核酸についても行うことができる。本方法はまた標本から単離され、"ドット (dot)"・プロットティング (Kafatosら, Nucl. Acid. Res. 7巻、1541-1552ページ (1979年); WhiteとBancroft, J. Biol. Chem. 257巻、8569-8572ページ (1982年); サザン・プロットティング (Southern, J. Mol. Biol. 98巻、503-517ページ (1975年)); "ノーザン" プロットティング (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 77巻、5201-5205ページ (1980年)); さらに、エレクトロ・プロットティング (StellwagenとDahlberg, Nucl. Acids. Res. 8巻、299-317ページ (1980年)) により固体担体上に固定された核酸についても行うことができる。

標本の核酸はまた、本発明を水層ハイブリダイゼーション (BrittenとKohre, Science 161巻、527-540ページ (1968年)) 及び水/有機中間層ハイブリダイゼーション (Kohreら, Biochemistry 16巻、5329-5341ページ (1977年)) に応用した方法によりアツセイすることもできる。水/有機中間層ハイブリダイゼーションは大変速い速度で進行する利点があるが、ビオチンのような有機層に可溶性の連結部分が核酸親和性分子に結合している場合は適していない。

本発明のアツセイ方法はまた、標本から単離され、ドット・プロットティングや"ウェスタン" プロットティング (例えば、実施例XIを参照せよ)、又は、マイクロ稀釈プレート・ウェルや計量棒上の固体担体に吸着させることにより、固体担体上に固定されたタンパクやポリ多糖についても行うことができる。

さらにまた、本発明の方法は、標本の細胞性タンパクや全細胞表面のポリ多糖 (例えば、実施例XIを参照のこ

と)、あるいは、レプリカ・プレートのバクテリアや酵母のような、固体担体上に固定した微生物由来のタンパクやポリ多糖などの検出に応用できる。

親和性分子が、アツセイしているサンプル中に存在するかもしれない検体と結合する前か、又は後に、複製型RNAは親和性分子に結合しなければならない。

"複製型RNA"とは、イン・ビトロで自動触媒的に複製される、即ち、イン・ビトロでRNA依存性RNAポリメラーゼによつて触媒される反応により複製されうるいかなるRNAでもよい。本発明の実践に適したRNAポリメラーゼ及び複製型RNAは以下の実施例Iに記述されている。

これに関連して、ここで述べるバクテリオファージQ $\beta$ は、特定の変種や突然変異体やその個体群に限定されない。そのような言及は特に制限しないならば、バクテリオファージQ $\beta$ の感染が疑われるE.coliの感染に際して、RNA依存性のRNAポリメラーゼの生産を起こすいかなる変種や突然変異体やその個体群に対してなされている。

それによる感染が疑われるバクテリアの感染に際して、RNA依存性RNAポリメラーゼ及び、それに関連した本発明に利用可能な、イン・ビトロで自動触媒的に複製されることができる複製型RNAを生産する他のファージについては、例えばMiyakeら, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 68巻、2022-2024ページ (1971年) を参照せよ。

複製型RNAは多くの異なる方法により親和性分子に結合させることができるが、そのうちのいくつかについては実施例に記述されている。

もし、複製型RNAが、親和性分子が検体に結合する前に、親和性分子に結合するのであれば、熟練者によく理解されているように、親和性分子の検体に対する特異性が失われていないことが必須であり、即ち複製型RNAに結合した親和性分子は、アツセイにおいて試験されている検体にいくらかの特異的をもつて結合する能力を維持していなければならない。

もし複製型RNAが、親和性分子が検体に結合した後で親和性分子に結合するのであれば、これも熟練した者にはよく知られているように、複製型RNAの結合した親和性分子を、親和性分子に結合していない複製型RNAから分離できることが必須である。このことは重要な問題ではない。通常の場合、検体に結合し、さらに固体担体に結合した親和性分子について、そのような分離は単に洗浄することにより容易に達成される。なぜならば、複製型RNAが、結合した親和性分子に結合することは、親和性分子と固体担体との関係を大きくこわしてしまうことがないからである。もし通常のケースが得られない場合には、そのような分離は、よく知られたクロマトグラフィーや電気泳動の技術のいずれかにより容易に達成される。

最後に、複製型RNAの親和性分子への結合は、RNA依存性のRNAポリメラーゼによるRNAの複製能を失わせないよ

10

20

30

40

50

うなものでなければならない。即ち、親和性分子に結合している複製型RNAは、RNA依存性RNAポリメラーゼによる複製の鋳型であるか、あるいは、親和性分子から分離されて、RNA依存性RNAポリメラーゼによる複製の鋳型の形態をとっていることができるのである。

複製型RNAと親和性分子との間の関係の1つのタイプは、親和性分子自体が複製型RNAで、主に適当な配列をもった部分を含む組み換えRNAであるものである。そのような親和性分子は、核酸やその断片である検体にむいているであろう。親和性分子は複製型RNAから、好ましくは、Mieleら、先に引用、及びKramerら、米国特許出願番号No.614,350の方法により、検体の部分配列と相補的な配列を含むように調製された組み換えRNAであろう。この相補配列の部分は、特異性を与えるためには少なくとも、長さは10リボヌクレオチドあり、複製能を失わないためには長さは約4500ヌクレオチドまでのものである。実施例IXに組み換えRNAを親和性分子として用いる例が説明されている。

複製型RNAと親和性分子との間の結合は、非共有又は共有的な結合でありうる。

親和性分子と複製型RNAの間の非共有的な結合は、親和性分子に、複製型RNA断片の相補的な配列の核酸部分が結合するかとりこまれるかして、さらに複製型RNAが親和性分子に結合するかとりこまれた部分とハイブリダイズすることにより形成されることができる。そのような核酸断片を、タンパクの親和性分子に結合させるものについては、例えばDatta Guptaら、ヨーロッパ特許出願広報No.0154884を参照せよ。核酸の親和性分子については、そのような断片を結合させたり、とりこませたりする方法は、技術分野においてよく知られている。親和性分子と複製型RNAとの間のそのような結合を用いて、複製型RNAが複製されて検出が可能になるような複製型RNAの検体に結合した親和性分子からの分離は、複製型RNA部分と親和性分子に結合した、あるいは、とりこまれた核酸部分との複合体の融解温度以上に加熱することにより達成される。

複製型RNAと親和性分子との間の非共有的な結合は、また、複製型RNAに結合した1番目の連結部分と、親和性分子に結合した2番目の連結部分の結合を通じて行われ、ここでいう連結部分とは特異的な結合対をさしている。

複製型RNAと親和性分子との間の共有的な結合は、唯一つ共有的な両者の間の結合（複合体の2次又は3次構造から生じた結合は除く）を通じて行われる。通常、共有的な結合は複製型RNAに共有結合した1番目の連結部分と、親和性分子に共有結合した2番目の連結部分と、さらに1番目と2番目の連結部分との間の共有結合が係わっている。

ここで述べた複製型RNA又は親和性分子に対する連結部分の“共有的な結合”又は“共有的な連結”又は“共

有的な接合”とは、連結部分とそれぞれの複製型RNA又は親和性分子との間の、2次又は3次構造から生じる結合以外のすべての結合が、共有的なものであることを意味している。ここで述べた、連結部分の複製型RNA又は親和性分子への“結合 (joining)”、“連結 (linkage)”、あるいは“接合 (connection)”とは、無条件に、連結部分が“共有的に”又は“非共有的に”、それぞれ複製型RNAや親和性分子と結合したり連結したりすることを意味している。“非共有的な”結合、又は連結、接合とは、連結部分と複製型RNAや親和性分子との間の、2次、3次構造による結合以外の、少なくともいくつかの結合が非共有的なものであることを意味している。

連結部分と複製型RNAとの間の共有的な結合で、それによつてRNAの複製能が失われないもののいくつかの例として以下のものが含まれる。

(a) 連結部分は、リン酸基であり、結合は、リン酸と複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素との間の直接的なもの。複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合したリン酸連結部分は、通常、核酸親和性分子の3'-ヌクレオチドの3'-炭素へあるいは、核酸親和性分子の3'-末端に結合していると考えられている連結部分で、さらに、その5'-ヌクレオチドの5'-炭素におけるリン酸を介して親和性分子の3'-ヌクレオチドの3'-炭素に共有結合している核酸断片の3'-ヌクレオチドの3'-炭素への直接の共有結合が、係わっている。複製型RNAの5'末端ヌクレオチドは、技術分野において既知の方法により、5'炭素をT4ポリヌクレオチド・キナーゼでリン参加することができる。実施例Iも参照せよ。親和性分子、あるいは親和性分子の核酸連結部分は、次に、T4RNAリガーゼを用いる既知の方法により、複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-リン酸に接続することができる。この後者の反応は、もし、リボヌクレオチドが親和性分子（又は親和性分子の連結部分）の3'-末端であればより効率的に進行する；技術分野において知られているように、単一のリボヌクレオチド末端デオキシヌクレオチド転移酵素を用いて、DNAの3'-末端に付加させることができるのである。

(b) 連結部分がビオチン又はイミノビオチン (imino-biotinyl) で式-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>a</sub>-NH(PQ<sub>2</sub>)O-、式-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-SS(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-NH(PQ<sub>2</sub>)O-、又は式-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>b</sub>-(CO)(NH)(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-NH(PQ<sub>2</sub>)O-のスペーサー・グループを介した複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素に連結したものの、ここで、それぞれ、リン酸アミド基は5'-ヌクレオチドに、そして、アミノ基はビオチン又はイミノビオチンに結合しており、aaは2から20、bbとccは同じか又は異つており、それぞれ2から20である。式-NH(CO)<sub>2</sub>-NH(PQ<sub>2</sub>)O-のスペーサー・グループをもつた複製型RNAは、ChuとOrge1, DNA, 4巻, 327-331ページ (1985年) の



方法に従い合成することができる。式 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_{aa}\text{SS}(\text{CH}_2)_{bb}\text{NH}(\text{PQ})\text{O}-$ のスペーサー・グループをもつ複製型RNAは、実施例Iに説明されている。式 $-\text{NH}(\text{CH}_2)_{aa}(\text{CO})(\text{NH})(\text{CH}_2)_{bb}\text{NH}(\text{PQ})\text{O}-$ のスペーサー・グループをもつ複製型RNAは、複製型RNAを、5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合した式

$-\text{O}(\text{PQ})\text{NH}(\text{CH}_2)_{bb}\text{NH}_2$ 基と式 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_{aa}\text{CO}_2\text{H}$ のアミノ・カルボン酸の活性エステルと反応させることにより合成される。1級アミノ基をもつたピオチン・アミド又はイミノピオチンアミド結合を生成させるピオチン又はイミノピオチンのN-ヒドロキシスクシンイミノ・エステル(N-hydroxysuccinimino)の反応は、技術分野において知られており、実施例で説明されている。

(c) 式 $-(\text{CH}_2)_{aa}(\text{NH})(\text{PQ})\text{O}-$ 又は $-(\text{CH}_2)_{aa}\text{SS}(\text{CH}_2)_{bb}\text{NH}(\text{PQ})\text{O}-$ のスペーサー・グループを介して連結したアミノ基連結部分のものでここでリン酸アミド基は、複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合しており、aa、bb、及びccは前述のように定義される。そのような複製型RNAの調製には、ChuとOrgel, DNA, 4巻, 327-331ページ、及び以下の実施例Iの方法が用いられる。

(d) 式 $-(\text{CH}_2)_{aa}\text{NH}(\text{PQ})\text{O}-$ のスペーサー・グループにより結合したイオウ連結部分のもので、ここでリン酸アミド基は複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合しており、ccは前述のように定義される。実施例IとXでは、そのような連結部分とスペーサーグループをもつた複製型RNAの合成について説明している。

アビジンやストレプトアビジンの連結部分と、複製型RNAの間の“非共有”結合の例は、アビジン又は、ストレプトアビジンがピオチン又はイミノピオチンと複合体を(ここで述べる複合体には非共有的な相互作用のみが係わっている)形成し、さらに、このピオチン又はイミノピオチンが先に述べたスペーサー・グループの1つにより複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合して複製型RNAにピオチン又はイミノピオチンを共有的に結合させたものであろう。

核酸の親和性分子については、連結部分との共有結合は、5'-ヌクレオチドの5'-炭素、3'-ヌクレオチドの3'-炭素、あるいはピリミジン又はプリン塩基の各種原子を介して形成させることができる。連結部分は、検体の断片の配列と相補的な配列をもつた親和性分子の断片のそれぞれ3'-、5'-末端から伸長する核酸断片の3'又は5'末端のヌクレオチドである。連結部分は、例えば、上述のスペーサー・グループの1つを介して、複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合するように、親和性分子の5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合した、ピオチン又はイミノピオチン、あるいは、硫黄原子であらう。ピオチン連結部分(複数のこともある)は、それにより親和性分子が検体にハイブリダイズする、検体の断片の配列と相補的な配列をもつ断片以外の核酸親和性分子の部分において、各種のス

ペーサー・アームを介してウラシル(uracil)残基(複数のこともある)の5'-炭素あるいはアデニン(adenine)残基(複数のこともある)の8'-炭素又は8'-炭素に結合していることもあろう。例えばRuth、特許協会条約広報No.84/03285;BrakeIとStarvianopoulos、ヨーロッパ特許出願広報No.0122614を参照せよ。複製型RNAについては、親和性分子に適当な特に親和性分子の検体に対する親和性を失わせないように、多くの他の連結部分やスペーサー・グループ、さらに、そのような連結部分やスペーサー・グループをもつた親和性分子の調製方法などが、技術分野において知られている。

抗体、抗原あるいは、レクチンの親和性分子については、多くの連結部分(例えば、ピオチン、複製型RNAのハイブリダイゼーションに用いる核酸断片、硫黄原子など)や、それらを、直接、又はスペーサー・グループを介して親和性分子に共有結合させる適当な方法が技術分野において知られている。例えば多くのピオチニル化された抗体やレクチンが購入可能である。

アビジン又はストレプトアビジンのような連結残基と、抗体、抗原、又はレクチン親和性分子との間の“非共有”結合の1つの例は、アビジン又はストレプトアビジンがピオチンやイミノピオチンと複合体をつくっており、これが、親和性分子に非共有的あるいは、共有的に連結したものである。例えばピオチンは、技術分野において理解されているように、ピオチニル化した抗-抗体、又は、ピオチニル化したブドウ球菌プロテインAと、抗体親和性分子の複合体を形成させることにより、非共有的に抗体親和性分子に結合させることができる。

技術における補足的な情報として、タンパクや核酸に連結残基を結合させる方法に関しては、例えばDreyerとDervan, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82巻, 968-972ページ(1985年); Forsterら, Nucl. Acids, Res. 13巻, 745-761ページ(1984年); Wardら、ヨーロッパ特許出願広報No.0063879; Englehardtら、ヨーロッパ特許出願広報No.0097373; AlagonとKing, Biochemistry 19巻, 4341-4345ページ(1980年); Imamら, Cancer Res. 45巻, 263-271ページ(1985年)を参照せよ。

複製型RNAに結合した1番目の連結部分と親和性分子に結合した2番目の連結部分は、(2つの硫黄原子連結部分から形成されるジスルフィド残基や、複製型RNAの5'-末端のリン酸に結合した核酸親和性分子の3'-末端から伸長したヌクレオチドのように)相互に共有結合したり、あるいは、(アビジン又は、ストレプトアビジンに結合したピオチンやイミノピオチン、対応する抗体に結合した抗原、又は、酵素に結合した酵素阻害剤のように)特異的な結合対として相互に非共有的に相互作用することにより、複製型RNAと親和性分子との間の結合を形成する。

先に示したように、親和性分子と複製型RNAとの間の共有結合の1つの例は、親和性分子がイン・ビトロで合

10

20

30

40

50

成される間か、又は、末端デオキシヌクレオチド転移酵素を用い、そして次に、T4RNAリガーゼを用いて、5'末端を介して(1つ又はそれ以上の)プリンの伸長3'-末端に複製型RNAを結合させる間に、DNA親和性分子の3'-末端に付加された伸長プリン残基を介して形成される結合である。技術分野において理解されているように、この連結部分の3'-末端におけるプリン・ヌクレオチドは、複製型RNAへの付加を効率よく進行させるためには、リボヌクレオチドであるべきである。そのような親和性分子-複製型RNAハイブリッドが検体に結合した後で、もし、これがRNAレプリカーゼの鋳型として活性できないときには、酸脱プリン反応、次にβ-脱離によりリン酸ジエステル結合を開裂させて、RNAをDNAから解離させることができ、そこでレプリカーゼの鋳型として用いることができる。

他の例には、T4RNAリガーゼを用いて、RNA親和性分子を複製型RNAのどちらかの末端に結合させるものがある。そのような分子は、複製型RNAと、検体とハイブリダイズする親和性分子の断片との間に、多少のリボヌクレオチドをもつように調製される。その結果得られたRNAは、もし親和性分子RNAが複製型RNAの5'-末端に付加しているのであれば、それ自体RNAレプリカーゼの鋳型となることができる。もし、その結果得られたRNAが、レプリカーゼの鋳型とはならない場合、親和性分子部分は、複製型RNA部分から解離させ複製型RNAを放出させる。そのような解離は、初めに、複製型分子と、検体にハイブリダイズする親和性分子部分の間の断片と相補的な配列をもつオリゴデオキシリボヌクレオチドと、分子をハイブリダイズさせ、(検体にハイブリダイズさせるか、又は検体にハイブリダイズさせた後、加熱する(又は融解する)ことにより遊離させ)、次に、RNAがDNAとハイブリダイズする位置で特異的にRNAを切断するリボヌクレアーゼHを用いて、開裂させるのである。Donis-Keller, *Nucl. Acids Res.* 7巻、179-192ページ(1979年)を参照せよ。

本発明に従う、親和性分子-複製型RNAハイブリッド化合物(即ち、親和性分子が複製型RNAに結合している化合物)の中には、“スマート・プローブ”がある。

“スマート・プローブ”とは、親和性分子が核酸であり、2番目の連結部分が親和性分子に共有結合しており、1番目の連結部分が複製型RNAに共有結合している、さらに1番目と2番目の連結部分が相互に共有結合している親和性分子-複製型RNAハイブリッド分子のことである(即ち、2次、3次構造による結合を除いて、2つの連結部分の間のすべての結合は共有である)。さらにスマート・プローブでは、親和性分子と2つを結合している1番目と2番目の連結部分、さらにこの2つの連結部分を結合しているいかなる部分も、理想的には、もし親和性分子部分が検体にハイブリダイズしていれば、あるいは、しているときだけハイブリッド分子の

複製型RNAが、RNA依存性のRNAポリメラーゼにより複製されるようになっているのである。要するに、このプローブはそれ自体検体と結合して検出を可能にするから“スマート”なのである。

本発明に従ったスマートプローブの1つの具体例は、複製型RNA部分が親和性分子部分の3'-末端断片の配列と相補的な配列をもつ、約10から30のリボヌクレオチドの短い断片を含む組み換え複製型RNAのものである。この組み換え複製型RNAは、例えば、Mielら、先に引用、及び、クラマー(Kramer)ら、米国特許出願番号0.614,350先に引用、の方法に従って合成する。親和性分子部分は、典型的には約75から150ヌクレオチドの長さで、これは、複製型RNA部分に組み換えられた部分の配列と相補的な配列をもつ部分よりもいくぶん長く、さらにこれは、技術分野において既知の多くのイン・ビトロやイン・ビボの方法のいずれかにより合成される。組み換え複製型RNAの5'-ヌクレオチドの5'-炭素と親和性分子部分の5'-ヌクレオチドの5'-炭素は、実施例I及びXの方法に従い、式- $O(PQ)_nNH(CH_2)_aSS(CH_2)_bNH(PQ)_mO$ -の部分によりスマート・プローブ中に結合させる。ここでaとbは同じか、または異なるものであり、それぞれ2から20である。そのようなスマート・プローブでは、親和性分子部分が何か他のものとより安定に結合していない場合(そのような結合は、実質的には、検体との特異的な結合か又は、非特異的な結合だけである)、親和性分子部分の3'-末端は、組み換えRNA部分とハイブリダイズしたままになっている。プローブの使用に際しては、初めにサンプルの核酸とのハイブリダイゼーションを行い、次にリボヌクレアーゼHの溶液を加えると、親和性分子部分が複製型RNA部分から解離していないスマート・プローブの、複製型RNA部分の開裂と複製能の喪失がおこる(Donnis-Keller(1979年)、先に引用、を参照せよ)；次に結合していないスマート・プローブを除くために短い洗浄を行い、さらに親和性分子部分が、複製型RNAがリボヌクレアーゼHによる開裂を受けないように、複製型RNAから解離してしまっている、少量の非特異的結合をおこしたスマート・プローブの量を減ずる；そして最後に、ジチオスレイトール(dithiothreitol)でジスルフィド結合を開裂して、複製型RNAを親和性分子から解離させた後で、RNAを複製し、複製したRNAを検出することにより検出を行うのである。

本発明のスマート・プローブのもう1つの具体例では、標的とハイブリダイズしていないプローブの複製型RNAを不活性化するのにリボヌクレアーゼHによる開裂を必要としない。この具体例では、親和性分子部分の5'-ヌクレオチドの5'-炭素は、他の具体例と同様に、式- $O(PQ)_nNH(CH_2)_aSS(CH_2)_bNH(PQ)_mO$ -の部分により、複製型RNA部分の5'-ヌクレオチドの5'-炭素に結合している。この具体例では、どんな複製型RNA

をも用いることができる。親和性分子部分に対応する組み換え複製型RNAを調製する必要はない。しかしながらこの具体例では、親和性分子部分は、本質的に以下の3つの部分から構成されている：即ち、親和性分子がハイブリダイズする検体の部分配列を相補的な配列中の約50から150ヌクレオチドからなる“検体-結合”部分；親和性分子の5'-ヌクレオチドから、検体結合部分の5'-ヌクレオチドへ伸長し、（しかしこの部分を含んではない）、複製型RNAの部分の配列と相補的な配列中の約30から60ヌクレオチドからなる“5'-クランプ（clamp）”部分；そして、検体-結合部分の3'-ヌクレオチド（しかし、この部分は含まない）から、親和性分子の3'-ヌクレオチドへ伸長し、親和性分子の5'-クランプ部分がハイブリダイズする部分よりも、さらに、複製型RNAの5'-末端に近接する複製型RNAの部分と相補的な配列中の、約30から60ヌクレオチドからなる“3'-クランプ”部分である。

技術分野において知られている方法による、この具体化では随意に、親和性分子の5'-クランプ部分及び3'-クランプ部分とハイブリダイズする複製型RNA部分の少なくともいくつかのグアノシン塩基はイノシンで置換することができる。この効果は、（クランプしていない）複製型RNAを複製の鋳型として活性なものとし、さらに、これら複製型RNA部分で、DNA-RNA塩基対を安定化し、逆にRNA-RNA塩基対を不安定なものにすることである。この具体例の親和性分子は、他の場合と同様に、既知のイン・ビトロ又はイン・ビボの方法により合成される。複製型RNA部分の親和性分子部分への連結は、実施例I及びXに従って行う。この具体例では、親和性分子の3'-クランプ部分と5'-クランプ部分の双方が、複製型RNAにハイブリダイズしている間、複製型RNAは非複製型に“クランプ”されており、複製の鋳型として不活性である。一度、スマート・プローブが、1つ、又は、他のクランプ部分が複製型RNAから解離するようにして親和性分子部分が十分な安定性をもつて結合するような何物かと、（それは本質的に検体だけであろう）遭遇すれば、RNAはとたんに複製可能になり検出可能な形をとる。本発明のスマート・プローブの具体例の利用に際して、まず初めに、サンプルの核酸とのハイブリダイゼーションを行い、次に、短い洗浄を行なつて結合していないスマート・プローブを除き、さらに、一方又は両方のクランプ部分が複製型RNAから遊離している。少量の非特異的な結合をしたスマート・プローブを減少させ、最後に、ジチオスレイトールでジスルフィド結合を開裂して複製型RNAを親和性分子から解離させた後、随意に、RNAを複製させ、複製したRNAを検出することにより検出を行うのである。

検体を含まない部位に非特異的に結合した複製型RNAから生じるシグナルは、本発明に従うスマートプローブを用いると減少してしまうので、比較的低いバック・グ

ラウンドを得るためのハイブリダイゼーションの後での長時間の洗浄の必要性は、技術分野において現在行われている典型的な核酸プローブ・ハイブリダイゼーション・アッセイに比べて、そのようなプローブを用いたアッセイでは小さなものとなる。

イムノアッセイや核酸プローブ・ハイブリダイゼーション・アッセイの技術に習熟した者には理解できることだが、“バック・グラウンド”を生じる、親和性分子や複製型RNAの（そのRNA部分あるいは一番目の連結残基部分を介しての）不可逆的な“非特異的結合”を取り除き、ただ検体に（親和性分子に結合したり又は結合しつづけて）連結した複製型RNAだけがアッセイ系に存在するように、必要な結合をおこさせ、洗浄のステップを行つた後で、系をRNA依存性のRNAポリメラーゼを用いる複製からなるプロセスにより、複製型RNAが検出可能になる条件にかけるのである。

現在の発明に従つてアッセイを行う上で、アッセイ中の検体に結合する又は結合している親和性分子に結合した複製型RNAは、親和性分子に結合している間か、あるいは、それから分離された後のどちらかにRNA依存性RNAポリメラーゼにより複製されることが必要である。複製型RNAを親和性分子から分離させる各種の方法を先に記述したがその中には、複製型RNAを親和性分子に結合させている連結部分の中の、又は、間のジスルフィド結合を還元的に切断する方法が含まれている。

複製型RNAをRNA依存性RNAポリメラーゼで複製する方法は、技術分野において知られている。一般に、RNAは、4つのリボヌクレオシド-5'-三リン酸、ATP、CTP、GTP及びUTPを含む適当な水系緩衝液中、単に酵素と混合し、適当な温度でインキュベートしなければならない。例では、好まれる酵素であるQ $\beta$ レプリカーゼを用いて複製を行う条件を説明している。Kramerら、M.Mol. Biol. 89巻、719-736ページ（1974年）；Kramerら米国特許出願広報No. 614,350；Mielら（1983年）先に引用、なども参照せよ。

別法として、親和性分子から解離した複製型RNAは、E CTEOLAペーパーのような、正に荷電した担体に結合させることができる（Sarisら、NucL. Acids. Res. 10巻、4831-4843ページ（1982年））。複製型RNAの結合したそのような担体は、適当な緩衝液を用いて4つのリボヌクレオシド-5'-三リン酸とともに適当な温度のもと、RNAレプリカーゼ（RNA依存性RNAポリメラーゼ）の溶液に懸濁させると（即ち液相の複製に用いたのと本質的に同じ条件である）、すると担体に結合したRNAの複製が起きるのである。Sarisら（1982年）上述；及びBresserら、Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 80巻、6523-6527ページ（1983年）を参照せよ。簡便なRNAの検出では、複製型RNAは正に荷電した担体に結合したままである。

複製型RNAは多くの異なる方法により検出することができる。



検出は、例えば、接触光プリンティング法 (Kutateladzeら, Anal. Biochem. 100巻, 129-135ページ (1979年)) のように複製型RNAの紫外線吸収により行うことができる。

複製されたRNAが放射活性をもつように、複製反応中、放射活性で標識した (例えば、 $^3\text{H}$ ラベルとか、 $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ラベルなど) リボヌクレオシド-5'-三リン酸を用いることにより、複製されたRNAをその放射活性により多くの既知の方法のいずれかを用いて検出することができる。

ビオチン又はイミノビオチンは複製型RNAにとりこませることができる、これはさらに既知の技術を用いて、RNAの結合したビオチンに結合し、簡単に検出することのできる色素の生成を触媒する、酵素-アビジン又は酵素-ストربتアビジン付加物として検出することができる。Matthewsら (1985年) 上述; Learyら (1983年)、上述; Wardら、上述; Englehardtら、上述、を参照せよ。ビオチン又はイミノビオチンの複製型RNAへのとりこみは、ウラシル残基の5位の炭素にスパーサーを介してビオチニル化されたUTPを、複製反応のレプリカーゼの基質として用いることにより行うことができる。そのようなUTPは既知の化合物である。さらに、そのようなUTPはQ $\beta$ レプリカーゼの基質となり、さらに、5位の炭素に結合したスパーサー・グループを介してビオチニル化されたウラシルを含むRNAは、その合成にそのようなUTPを用いたために、Q $\beta$ レプリカーゼが触媒する複製の鑄型となることが知られている。

複製の過程の結果生じたRNAもまた、Forsterら (1985年) 上述、の方法に従い、光ビオチン酢酸を用いてビオチニル化することができ、さらに次に、アビジン-酵素付加物-色素原化合物の系を用いて、複製反応においてビオチニル化したUTPを使って合成した複製型RNAと同様に検出することができる。

複製過程の結果生じたRNAは、T4RNAリガーゼの触媒する反応を用いて、複製型RNAの3'末端に蛍光修飾した核酸を付加することにより、蛍光をもたせることができる。Cossstickら, Nucleic Acid. Res. 12巻, 1791-1810ページ (1984年) を参照せよ。その結果得られたRNAの蛍光は、いくつかの標準的な技術のいずれかにより、RNAの検出に用いることができる。

複製されたRNAの検出に用いることのできるさらに他の方法の中には、核酸と特異的に結合する受容体物質を、複製が行なわれる系か、あるいは、複製型RNAが単離されているECTEOLAペーパーのような正に荷電した担体などの媒体に添加して、受容体物質から生じるシグナルを測定するものがある。そのような物質には以下のものが含まれる: "ステイン・オール (Stains all)" のような色素原染料 (Dahlbergら, J. Mol. Biol. 41巻, 139-147ページ (1969年)); メチレンブルー (Dingman & Peacock, Biochemistry, 7巻, 659-668ページ (1968年) 及

び銀染色 (Sammonsら, Electrophoresis, 2巻, 135-141ページ (1981年)、Igloi, Anal. Biochem. 134巻, 184-188ページ (1983年)); 例えば臭化エチジウムなどのRNAに結合する蛍光原化合物 (Sharpら, Biochemistry, 12巻, 3055-3063ページ (1973年); Bailey & Davidson, Anal. Biochem. 70巻, 75-85ページ (1976年)); Q $\beta$ レプリカーゼによる複製の鑄型となるRNAに特異的に結合する蛍光原化合物……例えばQ $\beta$ レプリカーゼの感染サブ・ユニットに共役するフィコビル・プロテイン (phycobiliprotein) (Diら, J. Cell Biol. 93巻, 981-986ページ (1982年)、Stryerら、米国特許No. 4, 520, 110) などである。

レプリカーゼの濃度が、鑄型RNAの濃度よりも濃いまでであり、さらにリボヌクレオシド-5'-三リン酸の濃度の制限を受けないと仮定すると、鑄型RNAの濃度は、レプリカーゼの触媒によるRNAの複製の間、時間とともに対数的に増大するであろう。鑄型RNAの濃度が、レプリカーゼの濃度と等しくなるか、を超えてしまった後では、リボヌクレオシド-5'-三リン酸の濃度の制限を受けないかぎり、鑄型RNAの濃度は、時間に直線的に増加するであろう。例えばKramerら (1974年) 上述、を参照せよ。

実施例Iに特定されるレプリカーゼ触媒による複製の条件下では、MDV-1 RNAは36秒毎にその濃度を倍化し、ついには、鑄型の濃度が酵素の濃度を上回ってしまうことが示されている。

レプリカーゼ触媒による複製反応系で、一定の反応時間の後の鑄型RNAの濃度は、鑄型RNAの初期濃度に関係することになる。もし、複製反応の間中、レプリカーゼの濃度が鑄型の濃度よりも高いものと仮定すれば、(さらにリボヌクレオシド-5'-三リン酸の濃度の制限を受けなければ)、反応終了時の鑄型RNAの濃度の対数は、鑄型の初期濃度 (反応開始時点の) 対数に、直接比例するであろう。レプリカーゼの濃度が鑄型の濃度よりも低くなつた後では、リボヌクレオシド-5'-三リン酸の濃度の制限を受けないかぎり、反応終了時の鑄型の濃度は、鑄型の初期濃度の対数に直接比例する。さらに、鑄型の濃度がレプリカーゼの濃度に等しくなるまでに要する反応時間は、鑄型の初期濃度の負の対数に比例する。

複製反応をより長時間進行させることにより、さらに大きな感度を得ることができる。

本発明に従うアッセイでは、検体を試験しているサンプルとコントロールサンプルの双方のテストサンプルについてできるだけ同じような条件下で同時にアッセイを行うのである。技術分野において理解されているように、コントロールサンプルは、検体を含まないか、あるいは既知の量の検体を含む点以外はテスト・サンプルと同様なものになるようにする。検体を含まないコントロールは "バツク・グランド" であり、それ以下のときは、検体を含むサンプルと含まないサンプルとを区別す

ることは不可能である。テスト・サンプルのアツセイで複製された複製型RNAの量又は濃度を、同時にアツセイしたコントロール・サンプルの量又は濃度と比較することにより、テストサンプル中の検体の存在をバック・グラウンド以上のレベルで決定することができるのである。もし、既知の濃度範囲の検体を加えたコントロール・サンプルを用いたときは、テスト・サンプル中の検体の濃度を推測することができる。

ここで、本発明を実施例によりさらに詳細にわたって記述してみる。

#### 実施例1

本実施例はビオチン及びアビジン（次に）の中間変種RNA（「MDV-1」RNAとする）への結合において、該RNAがQβRNAポリメラーゼに対する鋳型として活性を保持し、ビオチンまたはビオチン+アビジンから分離可能である、同方法を示す。ビオチン-アビジン特異的結合ペアを介してアビジンに特異的に結合する能力のために、ビオチンのみが付いたMDV-1 RNAはアビジン骨格が結合されうる（例えば、該親和性分子に直接自身で結合されるビオチンを介して）いずれの親和性分子に対しても普遍的レポーターとなり、その際、親和性分子の標的的生物ポリマー検体に特異的に結合する能力は損わない。ビオチンに特異的に結合する能力（ビオチンとアビジンとの間の特異的結合ペアに由来する）のために、ビオチン及びアビジン（ビオチンに対して複合体形成したもの）を結合したMDV-1 RNAが、ビオチン骨格が結合されうるいずれの親和性分子に対しても普遍的レポーターとして使用されうるが、その際該ビオチン骨格自身のアビジンに特異的に結合する能力または該親和性分子の標的的生物ポリマー検体に特異的に結合する能力は損わない。（アビジンは4つのビオチン-反応生部位を有しており、それ故ビオチン-アビジン-ビオチン結合という中間組成物となりうる。）

MDV-1 RNAはミール（Miele）ら、J.Mol.Biol.171巻、281-295ページ（1983年）において示される、中間変種RNA変異株と同じ配列を有しており、次の相違点がある。ミールらの配列の43位CがMDV-1 RNAにおいてUに変えられる。ミールらの配列の61位AがMDV-1 RNAにおいてGに変えられる。ミールらの配列における105位AがMDV-1 RNAにおいてUに変えられる。ミールらの配列の134位CがMDV-1 RNAにおいてUに変えられる。最後に、ミールらの配列における135位GがMDV-1 RNA配列においてAに変えられる。今述べられた配列をもつ特定のRNA変異株は本明細書の本実施例及び他の実施例に

おいて使用されたが、本変異株は、単に供給面で簡単に入手可能であるという理由から使用された。該Qβレプリカーゼによる試験管内での複製に対する鋳型となるいくつかのRNA（「野生型」中間変種RNA、MDV-1 RNAとは異なる中間変種RNAの変異株、ミニ変種RNA、マイクロ変種RNA、ナノ変種RNAのひとつ、同定はされているが名前がまだ決定されていない他の変種または上記いずれかの突然変異株で試験管内で該Qβレプリカーゼによる複製をうける能力を保持しているものを含む）もまた使用される。

さらに、QβRNA-依存生RNAポリメラーゼは、その試験管内における著しい安定性のために本発明に対する好適なレプリカーゼであるが、使用されうる技術において知られている他のRNA-依存性RNAポリメラーゼがあり、これは同ポリメラーゼが複製に対する鋳型として認識する複製可能RNAとともに非常に数が多い。これら他の酵素の中にはSPレプリカーゼ及びMS2レプリカーゼが含まれる。

Qβレプリカーゼを用いる酵素的合成により得られる5'-...MDV-1(+) RNAは一連の工程：

1) 5'-末端3リン酸基は子ウシ腸アルカルフオスファターゼとのインキュベーションにより除去され、[ガンマー-<sup>32</sup>P] ATP及びT4ポリヌクレオチド・キナーゼとのインキュベーションにより5'-末端1リン酸に換えられた；

2) 5'-フオスフォロイミダゾール基がカップリング試薬、1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミドの存在下イミダゾールとの縮合により合成された；

3) 該イミダゾール基はシスタミン・ジヒドロクロリドとのインキュベーションによりシスタミン基に転換された；

4) ビオチンがビオチニル化試薬、N-ヒドロキシサクシニミドビオチンとのインキュベーションによりシスタミンに結合された；そして

5) アビジンがアビジンとのインキュベーションにより5'-ビオチン基に結合された

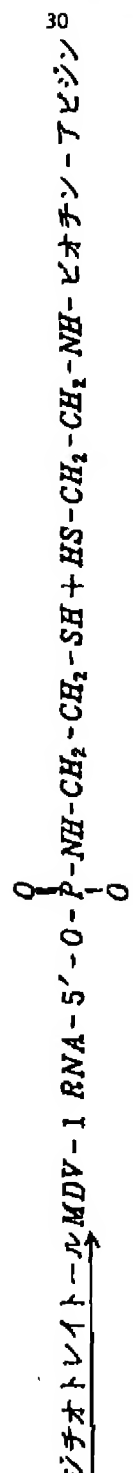
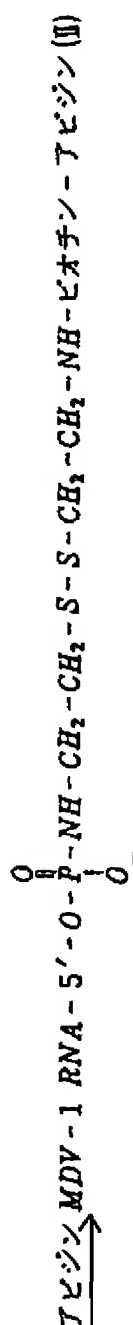
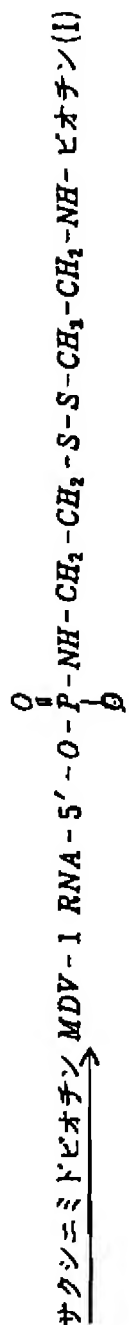
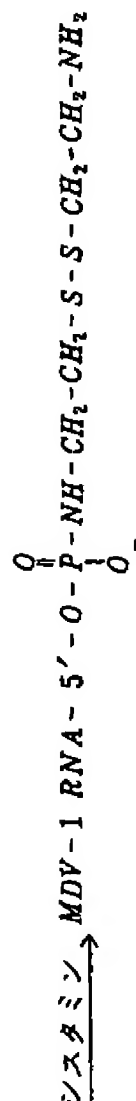
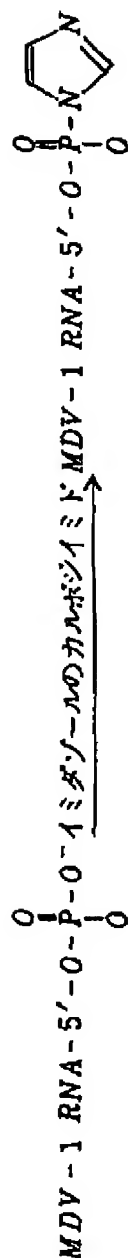
により5'-ビオチニル化MDV-1(+) RNA-アビジン付加物に転化された。また、6) 該5'-ビオチニル化MDV-1 RNA-アビジン付加物は部分反応した中間体からアクリルアミドゲル電気泳動により分離された。次の反応式の初めの4工程は上述の工程2)~5)を要約する：

10

20

30

40



式に示される5番目の工程は以下で述べるようにピオチン-アビジンからRNAを分離するための、シスタミン骨格のジスルフィドの還元の開裂を示す。

RNA-ピオチン-アビジン付加物 (II) の電気泳動上の移動度は、その大きさのため、5'-ピオチニル化 50

RNA前駆体 (I) の移動度よりも低かつた。

形成したRNA-ピオチン-アビジン付加物の量 (各ゲルのバンド中の放射活性を測定することにより決定される) はアビジン濃度の関数として漸近的に増加し、形成付加物25~35%で最大値に対した。RNA-ピオチン-ア

ビジン付加物 (II) の同定は3つの方法で確かめられた:

1) 該5'-シスタミンMDV-1 RNAがアビジンとインキュベートされ、生成物の電気泳動上の移動度が、未反応対照のそれと同定され、遅い移動バンド中の付加物は非

2) 同様に、該5'-リン酸化MDV-1 RNAがビオチニル化試薬と反応、電気泳動による精製、アビジンとのインキュベートのそれぞれがなされ、その移動度が同一のままであつた;そして

3) 遅い移動度のバンドから溶出される該付加物の80%以上がビオチニル化アガロースに結合していたが、5'-シスタミンを含む対照物の場合では10%以下であつた。

さらに詳細な記述として、ビオチン及びアビジンのMDV-1 (+) RNAの5'-末端への結合及び該付加物の同定が、材料を使い、次の方法に従つて行われた:

#### 酵素及び化合物

次のものが購入された: 子牛腸アルカリフوسفターゼ (ボーリング・マンハイムバイオケミカルス、インディアンポリス、インディアナ州、米国)、バクテリオファージT4ポリヌクレオチドキナーゼ (ファルマシアP-Lバイオケミカルス、ピスキヤタウエイ、ニュージャージー州、米国); リボヌクレアーゼT1及び高重合酵母RNA (キヤルバイオケム・ベアリング、サンディエゴ、カリフォルニア州、米国); N-ヒドロキシサクシニミドビオチン (シグマケイカル社、セント・ルイス、ミズーリ州、米国); 2,2'-ジチオビス (エチルアミン)-ジヒドロクロライド (CTCオーガニックス、アトランタ、ジョージア州、米国); 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (アルドリッチ・ケミカル社、ミルウォーキー、ウイスコンシン州、米国); ビオチン化アガロース (8ngアビジン/ml結合) 及びアビジンDN (ベクター、ラボラトリス、バーリングアム、カリフォルニア州、米国); 及び[ガンマー-<sup>32</sup>P] ATP及び[アルファ-<sup>32</sup>P] GTP (アマーシヤム、アーリントン・ハイツ・イリノイ州、米国)。Qβ RNAレプリカーゼは、ヨーヤング (Eoyang) 及びホガスト (August) (文献、ヨーヤングら、(1971年)、Nucleic Acid Research, G.L. カントニ (Cantoni) 及びD.R. デーヴィス (Davies) の編集による (ハーバー・アンド・ロー、ニューヨーク)、第2巻、829~839ページ中の操作) の操作により、バクテリオファージQβ感染大腸菌株Q13から単離され、該ヒドロキシアパタイトの工程は省かれた。

#### MDV-1 (+) RNAの調整

容易に同定及び単離が可能な (クラマー (Kramer) ら、J. Mol. Biol. 89巻、719-736ページ、974年参照) 中間変種RNAの変異株が実施例において使用され、ここでは「MDV-1 RNA」として言及される。この配列は前述さ

れる。758μgのMDV-1 RNAは、705ngのMDV-1 (+) RNA変異株鋳型及び69μgのQβレプリカーゼを、210分間、37°Cで1mM ATP、1mM CTP、1mM GTP、1mM UTP、15mM MgCl<sub>2</sub>、100mM トリス-HClを含有する1ml中、pH7.5でインキュベートすることにより合成された。該インキュベーション混合物は次にフェノールによる抽出 (メソツズ・イン・エンザイモロジー、L. グロスマン (Grossman) 及びK. モルデイブ (Moldave) による編集 (アカデミックス・プレス、ニューヨーク)、12巻、パートB、87-100ページ、1968年におけるK.S. カービー (Kirby) ) により脱タンパクされ、該RNAは、2M酢酸アンモニウム存在下-20°Cで2倍量のエタノールを用いる沈澱により単離された。MDV-1 (+) RNAはMDV-1 (-) RNAから、1mM MgCl<sub>2</sub>存在下アクリルアミドゲル電気泳動により分離された (D.R. ミルズ (mills) ら、セル、15巻、541-560ページ、1978年)。

#### 化学修飾RNAの分析及び単離

RNA中間体は、100mM NaCl、1mM EDTA、10mMヘベス (pH7.5) (T. マニアティス (maniatitis) ら、Molecular Cloning: ラボラトリ・マニュアル、コールド・スプリング・ハーバー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク州、1982年) で平衡化させたセファデックスG-50 (ファルマシア P-L バイオケミカルズ) を通ず、スピン・カラム・クロマトグラフィーによつて反応混合物から単離された。RNAは100mM NaCl存在下、-20°Cで2倍量のエタノール添加により、溶液から沈澱された。電気泳動は、90mM トリス-ホウ酸、pH8.3、1mM EDTA中で添加・展開される、厚さ1mmの6%ポリアクリルアミド・ゲル上で行われた。変性ゲルはまた、7Mの尿素を含有した。変性ゲル上での電気泳動前に、RNAは7M尿素中90°Cで1分間加熱により融解され、ただちに冷却された。ゲルのオートラジオグラフは、デュポン・クロネックス・ライトニング・プラス (Dupont Cronex Lightning Plus) 強化スクリーン存在 (あるいは非存在) 下、-80°CでコダックX-オマツトARフィルムに露出することにより得られた。RNAは500mM酢酸アンモニウム、pH7.5、1mM EDTA (T. マニアティスら、前述) により、ゲルから溶出された。

#### 5'-...MDV-1 (+) RNAの脱リン酸化

該5'-末端トリフوسفエートグループは2μgのMDV-1 (+) RNAから、0.7EU子牛腸アルカリフوسفターゼと30分間、50°Cで、50μlの50mM トリス-HCl、pH8、100μM EDTA中でインキュベートすることにより除去された。さらに0.7EU子牛腸アルカリフوسفターゼが加えられ、該インキュベーションはさらに30分間継続された。該反応は、該インキュベーション混合物を100mM NaCl及び2%ドデシル硫酸ナトリウム中に空け、これを15分間60°Cで加熱することにより停止された。該溶液は次にフェノール:クロロホルム (1:1) で2度、クロロホルムで2度 (T. マニアティスら、前述)

抽出することにより、脱タンパクされた。該脱リン酸化MDV-1 RNAは次にエタノールによる沈澱により単離された。

#### MDV-1 RNAの5' -<sup>32</sup>Pリン酸化

2 μgの脱リン酸化MDV-1 RNAは3分間、50°Cで、10 mM トリス-HCl 20 μl (pH 7.5)、1 mM スペルミジン、100 μM EDTA中でインキュベートされ、次いで、迅速に冷却された。該容量は次に12.2 p molの〔ガンマー-<sup>32</sup>P〕ATP (300 Ci/mol)、30 EU T4ポリヌクレオチド・キナーゼ及び、最終濃度でMgCl<sub>2</sub> 10 mM、ジチオトレイトール 1 mM、トリス-HCl 50 mM (pH 7.5) になる緩衝液を用いて40 μlとされた。この溶液は75分間37°Cでインキュベートされ、該混合物を20 mM EDTAに空けることにより停止された。該キナーゼは同量のフェノール：クロロホルム (1:1) で抽出され、該リン酸化MDV-1 RNAはエタノールを用いる沈澱により単離された。該RNAは、セファデックスG-50を通すスピン・カラム・クロマトグラフィー、それに続くエタノールによる再沈澱によつてさらに精製され、次いで1 mM EDTA-NaOH (pH 8) 中に懸濁化された。MDV-1 RNAの5' -シスタミン-MDV-1 RNAへの転化

2 μgの〔5' -<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNA及び16 μgの高重合酵母RNA (180 μgの酵母RNAと50 EUの子牛腸アルカリフوسفアターゼと1時間50°Cでインキュベートすることにより前もつて脱リン酸化されたもの) が3分間、50°Cで20 μlの1 mM EDTA-NaOH (pH 8) 中でインキュベートされ、次いでただちに冷却された。25 μlの1 M イミダゾール (pH 6) 及び2.5 μlの1.5 M 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドが次に加えられ、該混合物は1時間23°Cでインキュベートされた。RNAはこの混合物から、セファデックスG-50を通すスピン・カラムクロマトグラフィーにより単離された。

〔5' -<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNAの5' -イミダゾリド (非転化〔5' -<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNAを含む) は100 mM NaCl、1 mM EDTA、10 mM ヘス (pH 7.5) 100 μl 中で集められた。1 M 2'-ジチオビス (エチラミン) -ジヒドロクロライド (シスタミン・ジヒドロクロライド、pH 7.7) が次に加えられ、最終濃度25 mMとされ、該溶液は1時間50°Cでインキュベートされた。該RNAは次にセファデックスG-50を通すスピン・カラムクロマトグラフィーにより単離され、エタノールを用いて沈澱された。

#### 5' -シスタミン-MDV-1 RNAの5' -ビオチン化シスタミン-MDV-1 RNAへの転化

該5' -シスタミン-〔<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNA (非転化〔<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNAを含む) は200 mM ヘス (pH 7.7)、1 mM EDTA 40 μl に溶解され、40分間、23°Cでインキュベートされた。過剰のN-ヒドロキシサクシニミドビオチンは遠心分離により除去され、該RNAは次にエタノールを用いて沈澱された。該5' -ビオチン化MDV-1 RNA (I) (非ビオチン化RNAを含む) は変性ゲル上での電気泳動により過剰のN-ヒドロキシサクシニミドビオチ

ンからさらに分離された。該<sup>32</sup>P-標識バンド中のRNAは該ゲルから溶出されエタノールを用いる数回の沈澱により精製された。

#### 5' -ビオチン化MDV-1 RNAの非ビオチン化MDV-1 RNAからの分離

50から200 μgの部分5' -ビオチン化〔<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNAは2から10 μgのアビジンDN (ベクター・ラボラトリー、バーリングゲーム、カリフォルニア州、米国から購入されたアビジンの高純度型) と45分間、23°Cで10 mM ヘス (pH 7.7)、1 mM EDTA中でインキュベートされた。該5' -ビオチン化〔<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNA-アビジン付加物 (II) は、非ビオチン化〔<sup>32</sup>P〕RNA及び遊離アビジンから、変性ゲル上の電気泳動により分離された。該5' -ビオチン化MDV-1 RNA-アビジン付加物は次に該ゲルから抽出され、エタノールを用いて沈澱された。該RNA-ビオチン付加物 (II) のビオチン化アガロースとの複合体形成による同定

5' -ビオチン化された〔<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNA-アビジン付加物及び5' -シスタミン-〔<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNAは該ゲルから流出され、エタノールを用いて数回沈澱された。各付加物はビオチン化アガロース50 μlと15分間23°C、10 mM ヘス; pH 7、1 mM EDTA中でインキュベートされた。該アガロースは遠心分離により沈澱され、緩衝液を用いて2度洗浄された。該ビオチン化アガロースにより沈澱された、各放射活性付加物のフラクションはシンチレーション・カウンターで測定された。

#### 5' -チオ-エチルアミノ-MDV-1 RNA

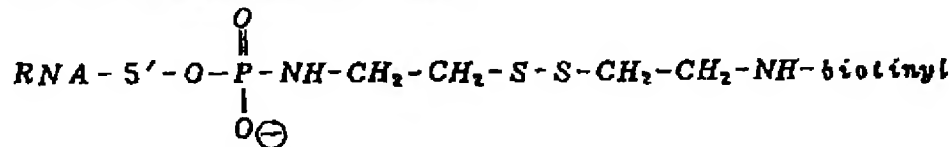
該〔<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNA-ビオチン-アビジン付加物はジチオトレイトールを用いる還元により、5' -チオ-エチルアミノ-〔<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNA及びビオチン-アビジン副産物に転化された。5' -ビオチン化〔<sup>32</sup>P〕MDV-1 RNA-アビジン付加物は、1時間、23°C、100 mM ジチオトレイトール (DTT) 30 μl、1 mM EDTA、10 mM ヘス (pH 7.7) 中でインキュベートされ、該スパーサー結合アームのジスルフィド結合を切断する。次にビオチン化アガロース40 μlが該反応混合物に加えられ、1時間23°Cでインキュベートし、ビオチン-アビジン副産物を結合する。該ビオチン化アガロースは遠心分離によつて該溶液から除去された。

放射活性の95%は上清液から回収され、ジスルフィド結合アームが切断されたことを確認する。非還元RNA-ビオチン-アビジン付加物がビオチン化アガロースとインキュベートされる対照反応においては、10%に満たない放射活性が上清液中に見い出された。

切断されたRNAはエタノールを用いる沈澱により回収され、100 μM ジチオトレイトール (還元RNAの二量を防ぐ) の存在下、非変性ゲル上の電気泳動により分析された。該5' -チオ-エチルアミノ-MDV-1 RNAは、5' -リン酸化MDV-1 対照RNAと同じ速度でゲル上を移動したが、非還元付加物はより遅い速度で移動した。該

5'-ビオチニル化MDV-1 RNA-アビジン付加物 (II) 及び該5'-チオ-エチルアミノ-MDV-1 RNAはそれぞれ、QβレプリカーゼによるMDV-1 RNA合成に対する鋳型として作用することが可能かどうかをみるために試験された。

試験されるべき、該修飾 [<sup>32</sup>P] MDV-1 RNA各5 μg は、37°Cで、50 μgの400 μM ATP、400 μM CTP、400 μM [アルファ-<sup>32</sup>P] GTP (500m Ci/m mol)、400 μM UTP 12mM MgCl<sub>2</sub>、84mMトリス-HCl (pH7.5) 中でインキュベートされた。2 μlの試料が、7分~15分の間毎分とられた。各試料はナンバード・セミサークル (孔径23mm) の3MM濾紙 (ワットマン) 上に吸着され、氷冷300mMリン酸、20mMピロリン酸ナトリウム、1mM EDTAを含むピーカー中に空けられた。該濾紙は同液を用いて6回洗\*



に示される、ビオチンの結合位置及びスペーサー・アームの長さによって得られる。RNA合成は該鋳型の非修飾3'末端 (A.K.バナージー (Banerjee) ち、J.Mol.Biol.46巻、445-455ページ、1969年) で開始し、該スペーサー・アームは該鋳型の5'末端での複製停止のために適当な長さ以上与えなければならない。

#### 実施例II

ヒト・ガンマ・グロブリン (IgG) は、A) 風疹に最近感染した被験者及びB) 風疹に感染していない被験者から単離され、その抗血清が前もって風疹抗原との反応に陰性であることが試験された。各試料中のIgGをビオチンに結合させるために、各試料はホウ酸緩衝生理食塩水 (pH8.5) 中で4mg蛋白/mlに希釈される。ジメチルホルムアミド (10mg/ml) 中に溶解した。ビオチニル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル50マイクロリットルが該希釈試料1mlごとに加えられる。該反応混合物は室温で2時間攪拌され、次いで、1ml当たりリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.4, 4°C) 1リットルに対して一晩透析される。結果としてできる溶液は、ビオチニル化IgGを含有し、4°Cでアジ化ナトリウム存在下保存される。

0.1M炭酸ナトリウム緩衝液中、pH9.8で風疹抗原で被覆されたウェルを有する。ポリスチレン・マイクロタイタープレートが、3時間室温でウェル当たり、1:10、1:30、1:100、1:300、1:1000、及び1:3000の希釈比で、上述のように調製されたビオチニル化IgG含有溶液50 μlとともにインキュベートされる。風疹抗原で被覆されないウェルをもつプレートが対照として使用される。IgG試料の希釈はPBS中で5%ウマ血清が用いられた。ビオチニル化IgG試料の希釈液とのインキュベーション後、該プレートはNaCl-トウイーン20を用いて3回洗浄される。

\* 浄され、ファイバー中にトラップされた沈着RNAから標識前駆体を流出した。該濾紙は次にエタノールを用いて1回洗浄、空気中で乾燥され、その放射活性はシンチレーションカウンター中で測定された。結果は両5'-修飾RNAがQβRNAレプリカーゼに対する鋳型として作用することを示した。各反応におけるRNA合成速度は、100ng/ml非修飾MDV-1 RNAを用いて開始した対照反応においてみられる合成速度と同じであつた。

本実施例は、ビオチンのMDV-1 RNAへの結合に含まれる化学的操作もアビジンの5'末端ビオチン基への場合も該RNA配列の酵素的複製に阻害を与えないことを示す。該5'-末端ビオチン-アビジンが該RNAの酵素的複製に阻害を与えない、という事は次図:

マイクロタイタープレートの各ウェルに、次いで実施例Iの場合のように調製されたMDV-1 ビオチン-アビジン付加物 (II) のPBS溶液が、1~10 μg/mlの濃度で加えられ、該ウェルは次に該溶液とともに2時間室温でインキュベートされる。次に該プレートはNaCl-トウイーン20を用いて3回洗浄される。

次にトリス緩衝液 (pH7.5) 中の0.1M DTTが全てのウェルに加えられ、結果としてできる混合物は室温で1時間インキュベートされる。

各ウェルは次にQβレプリカーゼ4.6 μgとともに、37°C、400 μM ATP、400 μM CTP、400 μM [アルファ-<sup>32</sup>P] GTP (500m Ci/m mol)、400 μM UTP、12mM MgCl<sub>2</sub>、84mMトリス-HCl (pH7.5) 50 μl 中でインキュベートされる。2 μlの試料が1分から15分の間、毎分とられる。各2 μlの試料はナンバード・セミサークル (孔径23mm) の3MM濾紙 (ワットマン) 上に吸着され、氷冷300mMリン酸、20mMピロリン酸ナトリウム、1mM EDTAを含むピーカー中に空けられる。該濾紙は同液を用いて6回洗浄され、ファイバー中にトラップされた沈着RNAから標識前駆体を流出する。該濾紙は次にエタノールを用いて1回洗浄、空気中で乾燥され、その放射活性はシンチレーションカウンター中で測定される。バックグラウンド以上の放射活性は検定血清中の抗-風疹IgGの存在を示唆するものである。

#### 実施例III

5'-ビオチン-ヘクス-P-16-mer (5'-biotin-hex-P-16-mer) は、ヘキサメチレンジアミンリンカーを介し16-マー5'-CACAAATCCACACAAC-3'に結合したビオチンから成り、ML3mp 8DNA断片と相補的配列をもつたもので、B.C.F.チュー (Chu) 及びL.E.オーゲル (Orgel)、DNA4、327-331ページ (1985年) に

従つて調製される。また、本参考文献に従つて、単一株のML3mp8DNAを10ng、0.1ng、0.01ng及び0.001ng含有するニトロセルロース・ブロットが調製され、DNAを含有しない対照ブロットも同様に調製される。

該ブロットは切断され、実施例Iの場合のように調製されたMDV-1 ビオチン-アビジン付加物大過剰と反応する、マイクロタイターウェルに移される（ウェル当り50 $\mu$ l、付加物濃度はPBS中約1 $\sim$ 約10 $\mu$ g/mlである）。各該ブロットは次にNaCl-トウイーン20で充分洗浄され、新たなマイクロタイターウェルへ移行、初めに10 トリス緩衝液（pH7.5）中0.1M DTTと1時間インキュベート、次いで先の実施例IIにおいて記述されたQ $\beta$ レプリカーゼ含有溶液50 $\mu$ l（ウェル当たり）とインキュベートされる。2 $\mu$ lの試料が1分 $\sim$ 30分の間、90秒ごとにとられ、シンチレーションカウンター中での放射活性測定のために実施例IIで記述されるようにろ過紙上にブロットされる。バックグラウンド以上の放射活性は該検定ブロット上のML3mp8DNAを示唆するものである。

#### 実施例IV

本実施例は、ブロットがDTTとともにインキュベートされないことを除いて、実施例IIIと同方法で行われ、結果として、MDV-1 RNAをビオチン-アビジンに結合するジスルフィド結合は切断されず、該MDV-1 RNAは16-merプローブ（及びML3mp8抗体）への結合を残している。しかしながら、該ブロットはQ $\beta$ レプリカーゼ溶液とインキュベートされ、試料がとられ、実施例IIIで記述されたように放射活性が測定される。

#### 実施例V

本実施例は、DTTとのインキュベーションの代わりにトリス緩衝液（pH7.5）が該ウェルに加えられ、該マイクロタイターが80°C10分間加熱され、ニトロセルロース・ブロットML3mp8抗体からMDV-1 RNAレポーター基に結合したブロットを遊離させることを除いて実施例IIIと同方法で行われる。室温に冷却後、該試料はQ $\beta$ レプリカーゼ溶液とインキュベートされ、そうでなければ実施例IVの場合のように処理される。

#### 実施例VI

実施例III $\sim$ Vで記述される16-merオリゴヌクレオチドプローブは、フォスター（Forster）ら、Nucleic Acids Res. 3巻、745 $\sim$ 761ページ（1985年）によつて記述されるように酢酸フォトビオチンを用いる光化学反応においてビオチニル化される。該ビオチニル化オリゴヌクレオチドはRPC-5を用いる高性能液体クロマトグラフィーによつて出発物質から分離される。該ビオチニル化16-merは次に実施例IIIの操作に従つてML3mp8 DNAの同定に供される。

#### 実施例VII

ML3mp8 DNAの300塩基断片がファージから得られ、ビオチンを用いて化学的に標識されるが、これは上記フォスターらの操作に従つて酢酸フォトビオチンを使用す

る。上記フォスターらによつて記述される。ドット・ブロット交配の操作が流用される。次に該ブロットは実施例IIIにおいて記述されるようにビオチン-アビジンレポーター付加物とインキュベートされ、実施例IIの操作の残りはML3mp8 DNAを同定するために流用される。実施例VIII

炭素5位へのスパーサーアームを通してビオチニル化された、ウリジン残基が上記ランガー（Langer）ら及び上記ラリー（Leary）らによつて記述されるニツク-翻訳の操作により、実施例IIIにおいて記述されるオリゴヌクレオチド中に導入される。次に結果としてビオチニル化される16-merについて、MDV-1 ビオチン-アビジンレポーター付加物を用いる実施例IIIの操作に従い、ブロットML3mp8DNAに対する検定が行われる。

#### 実施例IX

本実施例は核酸検体に対する「セルフ・レポータイング（自己報告）」親和性分子、すなわち本発明に従う検定系においてRNA自体の同定のための複製型RNAでもある親和性分子としての組換えRNAの使用を示す。

本実施例はまた、同定性を供する複製レポーターグループRNAのビオチニル化を示す。

ミール（Miele）ら（1983年、上記）及びクラマー（Kramer）らの米国特許出願第614,350号（上記）の操作に従い、30-merオリゴヌクレオチド5'-AGUCAGGCACCGUQUAUGAAUCUAACAAU-3'のついたMDV-1 RNA（MDV-1配列の63位Gと64位Uとの間に挿入されたもの）から成る、組換えRNAが調製される。該30-merはプラスミッドpBR322断片の配列と相補的なそれを有する（マニアティスら、上記の付録Bにおいて提供されるpBR322配列中の71 $\sim$ 100位をみよ。）

マシユーズ（Matthews）らのAnal. Biochem. 151巻、205 $\sim$ 209ページ（1985年）の操作に従い、ニトロセルロースの仲介により該組換えRNAはpBR322DNA2ng $\sim$ 0.01 $\mu$ gを含有するブロットにハイブリッド形成される。組換えRNA5ngが各ハイブリッド形成に使用される。該組換えRNAは煮沸により変性させられ、つづいてハイブリッド形成溶液（45%ホルムアミド、20mMリン酸ナトリウム、5 $\times$  SSC、0.1%フィコール400、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、250ng/ml変性サケ精子DNA、pH6.4）に加えられ。該ハイブリッド形成は次に12時間42°Cで行われる。

該ハイブリッド形成及びハイブリッド形成後の洗浄に続いて、該試料に対応する個々のサークルはブロットから切除、別個に処理され、トリス緩衝液（pH7.5）に空けられる。そして該サークルは10分間、100°Cに加熱され、ハイブリッド組換えRNAを溶液中に分離する。ウェル中の溶液は室温まで冷却された後、放射活性標識GTPが非放射活性GTPに換わり、非標識UTPがビオチニル化GTP（ビオチン-11-UTPがベセスダ（Bethesda）リサーチ・ラボラトリー、ガイゼルスブルク、メリーランド州、



米国から購入される；本品は11-アトム・スパーサー・アームを介してウラシル骨格の炭素5'位にビオチンが結合したUTPである、ランガーら、上記、をみよ；ワード（Ward）ら、欧州公報第0063879号）に換わっている、ことを除いて実施例IIにおいて記述されているものと同じQβレプリカーゼ溶液50μlが各ウェルに加えられ、該プレートは37℃でインキュベートされる。30分間90秒ごとに、96-指アリコッターを使用し、各ウェルから溶液2μlがニトロセルロースフィルター上にプロットされ（フィルター上にマークされた、各ウェルに対応するエリアをもつ）、各フィルターは、マシユーズらの操作に従い化学発光試薬（1.25mMレミノール、2.7mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.1M トリス緩衝液、pH8.6、増強剤として0.13M p-ヨードフェノールまたは0.68μM p-ヒドロキシケイ皮酸を共存）存在下ストレプタビジン-パーオキシダーゼ複合体とともに展開される。スポットからフィルターに発せられる光は次に蛍光マイクロタイター・プレート・リーダーを使用して感知される。バックグラウンド（すなわちpBR322DNA以外の検体について行われた操作によるスポット由来の放射）以上の放射は検定溶液中のpBR322

#### 実施例X

実施例IIに記述される16-merの、 $-\text{O}-\text{PO}_3-\text{NH}(\text{CH}_2)_4-\text{S}-\text{S}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$  グループと5'-ヌクレオチドの炭素5'位で結合した付加物は、ヘキサメチレンジアミンの代わりにシスタミンが使用されることを除いて、チュー（Chu）及びオーゲル（Orgel）、DNA4、327～331ページ、1985年の操作により調製される。本ジスルフィド付加物から、 $-\text{O}-\text{PO}_3-\text{NH}(\text{CH}_2)_4-\text{SH}$ と5'-ヌクレオチドの炭素5'位で結合した（2-チオエチル）アミノ付加物が0.1M DTTと1時間室温でインキュベートすることにより調製される。該チオ付加物は次に、1mM DTT存在下、RPC-5を使用する高性能液体クロマトグラフィーにより非還元ジスルフィド付加物から分離される。

MDV-1 RNAの、 $-\text{O}-\text{PO}_3-\text{NH}(\text{CH}_2)_4-\text{SS}(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$ と5'-ヌクレオチドの炭素5'位で結合した付加物は実施例Iで記述されるように調製される。同操作由来の生成物を含む、エタノール沈澱ジスルフィド付加物は次に0.1M DTT中に溶解され、結果としてできる溶液は1時間室温でインキュベートされ、対応するチオ付加物を与える。

MDV-1 RNAのチオ付加物約50ngを含有する、0.1M DTT溶液50μlが、16-merのチオ付加物10倍モル過剰量（すなわち、HDLC精製に由来する溶液量で、該チオ付加物を約30ng含有する。）と合わされる。結果としてできる溶液に $\text{O}_2$ 気流が15分間通され、2つのチオ付加物で生ずる反応は一晩室温で進行することが許容される。ゲル電気泳動を使用し、ジスルフィド含有骨格を介して16-merに結合したMDV-1 RNAは、他のMDV-1 RNA付加物及

び未反応16-mer付加物から分離される。

ジスルフィド含有骨格を介して16-merに結合したMDV-1 RNA付加物は次に、MDV-1 RNAビオチン-アビジンの代わりに、実施例IIIの操作に従いML3mp8DNAの同定に供される。

#### 実施例XI

本実施例は、本発明に基づくレポーター・システムを使用する、細胞表面上の特異的抗原の同定を記述する。ここで記述される操作は一部、ホラン-ハンド（Horan-Hand）ら、Cancer Research 43巻、728～735ページ（1983年）の教示に基づく。

本操作は標準技術によつて調製された、検定される抗原に対する、ネズミモノクローナルIgG抗体によつて例示される。当業者は、該抗原抗体に特異的な、他の型の抗体もまた使用されうということを把握するだろう。

（a）単一層培養細胞を使用する操作：

試験されるべき細胞は、平端な96穴フラット・ボトム組織培養プレート内に、適当な成長培地とともに植えられ、37℃で24時間インキュベートされる。成長培地は次に10%（W/V）ウシ血清アルブミン（BSA）を含有する成長培地と交換される。60分間のインキュベーション後、10% BSA含有培地は除去され、ウェルは洗浄媒体（1%（W/V）BSAを補った、RPMI 1640溶液）で洗浄される。該洗浄溶液は次に除去され、ウェル当たり、PBS中0.1mg/mlで、該抗原抗体に対するモノクローナル抗体50μlと交換され、該混合物は4℃で2時間インキュベートされる。インキュベーション後、未結合抗体は抗体溶液のアスピレーションにより除去され、続いて洗浄溶液を用いて洗浄される。洗浄に続いて、各ウェルに洗浄溶液を用いて1:1000に希釈した、ビオチニル化ウサギ抗血清IgG（ベクター・ラボラトリーズ、バーリングヘム、カリフォルニア州、米国から購入したもの）が加えられ、同溶液はウェル中、4℃で2時間インキュベートされる。該抗-IgG抗体溶液は次にウェルからアスピレートされ、ウェルは洗浄溶液を用いて再度洗浄される。次に各ウェルに実施例IのMDV-1 RNAビオチン-アビジン付加物のPBS溶液50μlが、1～10μg/mlで加えられ、同溶液はウェル中4℃で2時間インキュベートされる。本溶液は次にウェルからアスピレートされ、ウェルは洗浄溶液で3回洗浄される。トリス-HCl緩衝液（pH7.5）中0.1M DTT50μlが次に各ウェルに加えられ、1時間室温でインキュベーションが行われる。次に、96指-アリコッターを使用して各ウェルから上清が新しいマイクロタイター・プレートに除去され、実施例IIの操作に従い、同溶液はQβレプリカーゼ溶液と合わされて組換えMDV-1 RNAに対する検定が行われる。

（b）懸濁液中の細胞を使用する操作：

懸濁液中の細胞は、単一層培養細胞に対して使用される操作による特異な抗原に対して、次の修飾をすることによつて試験されうる：

細胞が単一細胞懸濁液（例えば、血清由来のリンホサイト）の形で得られない場合、適当に処理され、そのような懸濁液を調製する。例えば、組織培養由来の細胞は標準技術によりトリプシン処理され、培養容器表面から解離させることが可能で、結果としてできる溶液は次に、培養容器から適当な溶媒中にピペットで移すことが可能である。

単一細胞懸濁液中の細胞は次にマイクロ・タイタープレート（ウエル）に分けられ、添加されたBSAを含まないRPMI 1640溶媒を用いて2度洗浄される。懸濁液中の細胞は次に2時間4℃で、ウエル当たり、注目している抗原に対する抗体のPBS中0.1ml/mlのもの50μgとともにインキュベートされる。

本操作の残りは単一層培養細胞に対する操作と同じである。懸濁培養中の細胞の洗浄はベレットを生ずる遠心分離、培地のアスピレーション、次いで、新たな溶媒（洗浄溶媒）中でのベレットの再懸濁化、再ベレット化及び溶媒のアスピレーションのサイクルによつて行われる。

本実施例の操作に対して、抗原検体を含まないとして知られる、細胞が対照として使用される。

本実施例で上述される操作は、抗原検体に結合する初期抗体へのビオチニル化第2抗体の結合を含む。又は、初期抗体自体は、ビオチニル化が、その抗原検体に特異的に結合する能力をなくさないとすればビオチニル化が可能であり、第2抗体結合工程が遅けられる。抗体のビオチニル化は、イマム（Imam）ら、Cancer Research 45巻、263-271ページ（1985年）の操作に従い、抗体のN-ヒドロキシサクシニミドビオチンとの直接反応により実行される。

#### 実施例XII

本実施例は本発明に基づく、細胞溶解質、血清または他の溶液から蛋白質を同定する検定の使用を記述する。記述される操作は「ウェスタン・ブロット（Western blot）」法の一型式である。

細胞が関与する場合、細胞溶解質が、2%ドデシル硫酸ナトリウム、2%2-メルカプトエタノール及び10%グリセロールを含有するトリス-HCl緩衝液（pH6.8）溶液（100℃）を用いて可溶化するような標準操作によつて調製される。

該溶解質（または血清または他の溶液）は次にデユブリケート中ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供されるが、隣接するレーンにマーカーとして同定される蛋白質を移動させる。標準的なブロッティング装置（例えば、トランス・ブロット装置、バイオ・ラット・ラボラトリーズ、リッチモンド、カリフォルニア州、米国）を使用し、該蛋白質はゲルからニトロセルロース・シートへ移される。実験ゲルレーンのひとつ及びマーカーゲル・レーンはクーマシー・ブルーを用いて染色される。該蛋白質検体を含有する可能性のあるゾーンは、試料中

に存在するとすれば次に実験レーンから切断される。検体を含有する可能性のあるゲルゾーンに対応するニトロセルロースペーパーのゾーンはペーパーから切断され、蒸留水中3（w/v）BSAを用いて1時間37℃で浸され全ての非特異的蛋白質結合部位を飽和させる。

親和性分子として該蛋白質に対するビオチニル化抗体を使用して、該蛋白質検体がニトロセルロース片上にあるかを試験するために次の実施例の操作が行われる。

#### 実施例XIII

10 本実施例は本発明に基づく検定を用いる、細胞表面糖蛋白質の同体を例示する。本実施例の操作はゴードン（Gordon）及びペナ（Pena）、Biochem.J.208巻、351-358ページ（1982年）のそれを変えたもので、彼らはイラミナーゼ処理、培養、正常及び異常それぞれのヒト・皮膚繊維芽細胞上の特異的細胞表面糖蛋白質を同定するためのビーナッツ凝集素及びヒマノ実凝集素を使用した。

細胞は培養皿上に約 $2 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup>の密度で植えられ、24時間後、同細胞は洗浄され、2%（w/v）ドデシル硫酸ナトリウム、2%（w/v）2-メルカプトエタノール、10%（v/v）グリセロール、0.01%プロモフェノール・ブルーの0.125Mトリス-HCl緩衝液（pH6.8）溶液（100℃）を用いて可溶化される。該溶解質は次にSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供され、蛋白質はトランス・ブロット装置（バイオ・ラット・ラボラトリーズ）を使用してニトロセルロースシートへ移される。該ニトロセルロースシートは約5 cm<sup>2</sup>の大きさの切片に切断される。結果としてできるニトロセルロース片は3%（w/v）BSA水溶液に1時間37℃で浸され、全ての非特異的蛋白質-結合部位を飽和する。該片は次にHBS溶液（1

30 37mM NaCl, 2.7mM KCl, 0.9mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5mM MgCl<sub>2</sub>, 39mMヘベス、pH7.4）を用いてすすがれ、ビオチニル化レクチン（該溶解質の糖蛋白質上の注目している炭化水素骨格に適切なものである）とともに、3%BSAを含有するHBS溶液中10mg/mlにおいて、1時間室温でインキュベートされる。ビオチニル化レクチンは市販品であり、例えばベクター・ラボラトリーズ（ベーリングームカリフォルニア州）、から得られる。該片は次に、HBS溶液を用いて30分間4回浸たすことにより充分洗浄され、実施例IのMDV-1 RNAビオチン-アビジン付加物0.5mlと、PBS中約5 μg/mlで1時間、室温でインキュベートされる。アビジン-ビオチンMDV-1 RNA付加物とのインキュベーション後、過剰の付加物はHBSを用いて3回洗い流される。該片は次にトリス-HCl（pH7.5）中0.1M DTT、5mlと1時間インキュベートされ、結果としてできる溶液は、QβレプリカーゼにRNA複製を触媒させて、実施例IIの操作によりMDV-1 RNAに対する検定が行われる。実施例XIV

50 生物標本（例えば、細胞培養、組織、血液、他の体液、食品材料など）由来の核酸は、本発明に基づく検

定、すなわち、第一に核酸をひき出す標準技術（例えば、標本約5  $\mu$  lを45°Cで20分間、30mMトリス-HCl、2 mM EDTA、3%トライトンX100、300  $\mu$  g/mlプロテアーゼ K、pH7.5）約5  $\mu$  lから約1mlとともにインキュベートすることにより標本を破壊し、次に結果としてできる溶液を固体担体（例えばニトロセルロース）上にプロット、そして実施例III〜Xに記述されるような操作を行い該核酸検体を同定することによつて検体断片または検体分子に対する検定が行われる。

このような検定における対照は、検定されている生物標本と同じであるが検体を含まないことが知られているものでありうる。

標本中の検体量の定量的評価のために、既知量の検体に加えられた対照が実験され、標本中の検体量が、試験標本に由来する複製型RNAの複製率と対照に由来する複製率とを比較することにより評価されうる。

#### 実施例XV

実施例IXの操作が、非修飾リボヌクレオシド3リン酸が複製反応において使用され、複製RNAが次のように同定されることを除いて、流用される：

整数比希釈（等容量のもの）された複製反応溶液が96-指アルコツターを用いてジエチルアミノエチルセルロースペーパーのシートに移される。

該シートは次に室温で200mM NaCl、300mM酢酸アンモニウム（pH6.0）溶液中洗浄され、RNA中にとり込まれなかつたリボヌクレオシドを除去する。

該シートは次に0.3  $\mu$  g/ml臭化エチジウムを用いて染色される。シャープ（Sharp）ら、Biochemistry 12巻、3055〜3063ページ（1973年）及びベイリー（Bailey）及びデビッドソン（Davidson）、Anal.Biochem.70巻、75〜85ページ（1976年）を見よ。

最後に個々のプロットからの蛍光がいくつかの既知技術のいずれかひとつによつて測定される。対照プロット由来の蛍光強度以上の、染色プロット由来のそれは染色プロットに対応する試料プロット中の検体（すなわちpBR322）の存在を示す。

他の染色材料が臭化エチジウムの代わりに使用されうる。これらの中にはメチレン・ブルー（ディングマン（Dingman）及びピーコック（Peacock）、1968年上記）；銀染色（サモンズ（Sammons）、1981年、上記；イグロイ（Igloi）、1983年、上記）；またはフィコビリ蛋白質-Q $\beta$ レプリカーゼ共役体（オオイ（Oi）ら、1982年、上記；ストライヤー（Stryer）ら、上記）が含まれる。

さらに、蛍光測定よりもむしろ、RNAの染色に由来するプロットの色が評価されうる。

#### 実施例XVI

大腸菌K-12/600株の培養物がpBR322を用いて形質転換され、テトラサイクリン存在下 $10^8$  cells/mlまで培養される。0.1mlの培養液が30mMトリス-HCl、2mM EDTA、

3%トライトンX-100、300  $\mu$  g/mlプロテアーゼ K（pH7.5）溶液の0.1ml、1ml、10ml、100ml及び1000mlのそれぞれに合わされ、結果としてできる溶液45°Cで20分間加熱される。

対照溶液がテトラサイクリン非存在下pBR322を用いて形質転換されていない大腸菌K-12/600株を $10^8$  cells/mlまで培養し、次に同培養液0.1mlと上記で特定したプロテアーゼ K溶液0.1mlとを合わせ、結果としてできる溶液を20分間45°Cで加熱することにより調製される。

次に各5試験溶液の各3試料及び対照溶液の3  $\mu$  lが、ニトロセルロース担体上へドット・プロットされる（標準96-穴配列中、96スペースの18スペースに施される）。該担体は次に400mM NaOHを用いて飽和させたペーパー・タオルの先端におかれ、DNAを変性、次に連続的に（a）400mMトリス-HCl、pH7.0（b）20X SSC及び（c）10X SSCで飽和させたペーパータオルと接触される、最後に該ニトロセルロースシートは80°Cで90分間焼かれる。

実施例IXの30-merが、実施例I及びXの操作に従い、式-O(PO<sub>3</sub>)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SS(Q<sub>6</sub>)<sub>3</sub>NH(PO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O-という骨格〔ここで、フオスフォラミデートグループは30-mer親和性分子及び複製可能RNAの5'-ヌクレオチドの炭素5'位に結合している〕によりMDV-1(+) RNAに結合している。

標準操作に従い、該シートは前ハイブリッド形成され、次に結果としてできる親和性分子MDV-1 RNAハイブリッド形成溶液中3  $\mu$  g/mlで、ハイブリッド形成され、ハイブリッド形成後は洗浄され、ハイブリッド形成されなかつた親和性分子-MDV-1 RNAハイブリッドを除去する。

次に該ニトロセルロースシートはエクテオラ（ECT-EOLA）ペーパー（サリス（Sarris）ら、1982年、上記）シートの先端（または乾燥ペーパー・タオルの先端）におかれる。0.05Mトリス-HCl（pH7.5）中0.1M DTTで飽和した湿つたスポンジが該ニトロセルロース・シート先端におかれる。DTT溶液のペーパータオルへの毛細管移動に伴い、複製型RNAは、該ハイブリッドのジスルフィドの還元により遊離され、エクテオラ・ペーパー（ここで、正電荷により付着される）へ移される複製となる。

該エクテオラペーパーは次に100  $\mu$  g/ml BSA溶液とインキュベートされ、蛋白質結合部位をブロックする。

該ペーパーは次に実施例IIにおいて記述されるQ $\beta$ レプリカーゼ溶液と15分間インキュベートされる。

15分間のインキュベーションに従い、該ペーパーは20 mM NaCl、5mMリン酸ナトリウム（pH6.5）を用いて洗浄され、とり込まれなかつたリボヌクレオチドを除去する。該エクテオラ・ペーパー上の各プロットの放射活性は次に例えば、96-位 $\beta$ -放射スキヤナー/デジタイザー（ゴウリアノス（Goulianos）ら、Anal.Biochem.103巻、64-69ページ、1980年）を使用して決定される。

また、該複製は非放射活性リボヌクレオシド3リン酸のみを用いて行われ、RNA量はその固有のUV吸収（例えば、クラテラゼ（Krateladze）ら、1979年、上記らのフォトプリンティング法による）により決定されうるし、あるいは該エクテオラ・ペーパー上で直接、実施例XVで記述される染色技術のひとつによつても決定される。

検定される溶液中のpBR322の存在は該エクテオラ・ペーパー上の対応するRNA複製プロットに由来する、バックグラウンド信号（対照溶液に由来する）以上の信号により示される。

#### 実施例XVII

大腸菌K-12/C500株の培養液（pBR322を用いて形質転換されたもの及びされていないもの）が実施例XVIの場合のように調製される。

次に未希釈対照液、未希釈pBR322-形質転換培養液、1:10希釈pBR322-形質転換培養液、1:100希釈pBR322-形質転換培養液、1:1000希釈pBR322-形質転換培養液及び1:10000希釈pBR322-形質転換培養液（全ての希釈は細胞非存在培養地を用いる）それぞれの各3試料がポリプロピレン・マイクロ遠心分離チューブに加えられる。各ウエルに30mMトリス-HCl、2mM EDTA、2%トライトンX-100、300μg/mlプロテナーゼK（pH7.5）溶液5μlが加えられる。該プレートは次に20分間45°Cでインキュベートされる。20分の終わりに、温度が100°Cに上げられ、インキュベーションをさらに5分間続ける。該プレートを室温に冷却後、実施例XVIの親和性分子-MDV-1 RNAハイブリッドの水性塩溶液/フェノール懸濁液8μlが5μg/mlで各ウエルに加えられ、ハイブリッド形成がコーン（Kohne）ら、（1977年）、上記に従い5 \* 30

\* 分間行われる。

各ウエル由来の水-フェノール混合物は次にアガロースゲル電気泳動に付され、pBR322（親和性分子-MDV-1 RNAとハイブリッド形成したもの及びしないもの）をはるかに小さい新和性分子-MDV-1 RNAから分離する。該ゲルは0.1M OTT、0.05Mトリス-HCl（pH7.5）中に浸され、親和性分子と該RNAとの間のジスルフィドの開裂により複製型RNAを遊離する。

該複製型RNAは次に電気プロッティング（ステルワーク（Stellwag）及びダーベルク（Dahlberg）、Nucleic Acids Res. 8巻、299-317ページ（1980年））によりエクテオラ・ペーパーに移される。

最後に、複製RNAがエクテオラ・ペーパー中に複製プロットされる工程後、実施例XVIの操作が流用され、複製可能RNAの複製、該複製RNAの同定、及び検定される試料中にpBR322が存在するか否かの確認が行われる。

本発明は、RNA-依存性RNAポリメラーゼによるRNA複製に基づくレポーターシステムの使用により達成される感度のために、先行技術のシステムよりも有意に進歩した生物検定システムを含む。これらのレポーターシステムを使用する検定の感度は、親和性分子及び複製可能RNAの非特異的吸着に由来するバックグラウンドのみによつて測定されるべきである。そうでなければ、このような検定の感度は、試料当たり1分子という理論的制限にとどめられるべきである。

本発明はある程度の明細をもつて記述されてきたが、等業者にとっては自明な修飾が本発明の方向から逸脱することなくなされうる。

本発明の様々な特徴は次の特許請求の範囲において提示される。

フロントページの続き

(73)特許権者 999999999

ザ・トラスティーズ・オブ・コロンビア・ユニバーシティ・イン・ザ・シティ・オブ・ニューヨーク  
アメリカ合衆国ニューヨーク州10027、  
ニューヨーク、ブロードウェイ・アット・ウェスト・ワンハンドレッドアンドシックスティーン・ストリート（番地なし）

(72)発明者

チュー、バーバラ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州92014、  
デル・マー、リュート・レ・バルク  
13716、アパートメント シー

(72)発明者

クレイマー、フレッド・アール  
アメリカ合衆国ニューヨーク州10463、  
ニューヨーク、ウエスト・トゥーハンド  
レッドアンドサード・ファースト・スト  
リート 561

(72)発明者

リザルディ、ポール  
メキシコ合衆国モレロス、クエルナバ  
サ、アベニュー・ディアズ・オルダズ・  
エスクワイア・アトラコムコ501、ハ  
ウス・ナンバー 9

(72)発明者

オージェル、レスリー・イー  
アメリカ合衆国カリフォルニア州92037、  
ラ・ホーラ、テリーヒル・ドライブ  
6102